



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**GISELE OLIVO**

**VALIDAÇÃO E ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO  
DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS  
BIOGÊNICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA EM MATRIZ DE ATUM (*Thunnus spp*)**

**Florianópolis, SC  
2013**



**GISELE OLIVO**

**VALIDAÇÃO E ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO  
DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS  
BIOGÊNICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA EM MATRIZ DE ATUM (*Thunnus spp*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Roseane Fett

**Florianópolis, SC  
2013.**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Olivo, Gisele

Validação e estimativa da incerteza de medição de um método para determinação de aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência em matriz de atum (*Thunnus spp*) / Gisele Olivo ; orientadora, Roseane Fett – Florianópolis, SC, 2013.

123 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós- Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Validação de métodos. 3. Incerteza de medição. 4. Aminas biogênicas. 5. Atum. I. Fett, Roseane. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

**VALIDAÇÃO E ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO  
DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS  
BIOGÊNICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA EM MATRIZ DE ATUM (*Thunnus spp*)**

Por

**GISELE OLIVO**

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos pela comissão formada por:

Florianópolis, 25 de março de 2013.

---

Profa. Roseane Fett, Dra.  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora**

PRESIDENTE \_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Roseane Fett (UFSC)  
Orientadora

MEMBRO \_\_\_\_\_  
Dr. Heitor Daguer (MAPA)

MEMBRO \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna (UFSC)

MEMBRO \_\_\_\_\_  
Profa Dra Jane Mara Block (UFSC)



## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Gaspar João Olivo e Judith Meneghel Olivo e à minha nona Jandira Scarpato por me apoiar, me dar força e incentivo em minhas escolhas e também por orientar a trilhar os caminhos corretos sempre com muito amor e carinho;

À minha irmã Sarah Meneghel Olivo pela companhia, por compartilhar bons momentos por colocar em minha vida a pessoa mais especial do mundo, a minha Tininha, minha alegria diária.

À Profa Dra Roseane Fett por me aceitar em seu grupo de pesquisa e pela confiança e orientação no meu trabalho até o último minuto do segundo tempo.

Ao Luciano Valdemiro Gonzaga, a quem tenho profundo respeito e admiração, pela orientação na execução deste trabalho e pelos ensinamentos.

Ao Prof Dr Ernani Sebastião Sant'Anna pelo incentivo para realização do mestrado e pela confiança no meu trabalho.

À Patrícia Taha, pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pelo incentivo, tenho grande admiração por você. Sou muito grata pela grande contribuição na minha vida profissional.

Aos grandes amigos que tenho o prazer da convivência diária e que com certeza tornam todos os dias verdadeiramente especiais: Mayara da Silva, Joseana Matos, Pedro Ivo Fuchs, Aloísio Souza, Renata Bongiolo Magenis, Daiane Bobermim, Patrícia Vargas e Larissa Ramos. Tenho vocês no meu coração sempre e para sempre!

Aos colegas e amigos do laboratório de físico-química de alimentos: Rafael Burin, Manu, Danilo, Renata, Aline, Vini, Mirela, Amanda, Sabrina, Paula, Matheus, D. Sonia pela parceria no trabalho, em especial ao Luciano Molognoni que além da parceria, contribuiu neste trabalho.

Aos colegas do laboratório de química de alimentos, em especial à Graciele Campelo Borges, pelos ensinamentos e paciência, à Profa Dra Ana Carolina Costa pela ajuda desde o início do trabalho e à Andressa e Mônia, pelo incentivo nos momentos finais.

A todos professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC, que contribuíram para minha formação acadêmica. E ao Sergio pela força nos últimos dias.

À minha família, pelo carinho, amizade, companheirismo! Vocês me tornam mais forte!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com o meu trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições no trabalho.

Muito Obrigada.



Escolha um trabalho que ama e não terá que  
trabalhar um único dia de sua vida.

Confúcio



**Olivo, Gisele.** Validação e estimativa da incerteza de medição de um método para determinação de aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência em matriz de atum. 2013. 101 pg. Dissertação de mestrado em Ciência dos Alimentos – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis – SC.

## RESUMO

As aminas biogênicas são bases nitrogenadas de baixa massa molecular, formadas através da descarboxilação de aminoácidos precursores. A presença de aminas biogênicas em alimentos, do ponto de vista quantitativo, tem grande importância tendo em vista que se originam pela ação de micro-organismo e sua presença pode indicar o grau de frescor do produto. Por esse motivo são empregadas como parâmetro de qualidade. Visando atender à necessidade de avaliar amostras de pescado quanto a sua qualidade, foi desenvolvido um método rápido de simples execução, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para análise de aminas biogênicas. Para garantir a qualidade das medições o método desenvolvido foi validado nos quesitos: especificidade, seletividade, faixa de trabalho, linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão e robustez. O método validado tem um tempo total de corrida de 12 minutos, com separação total das aminas estudadas: triptamina, putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina. O método apresentou-se linear na faixa de 1,5 à 30 mg.kg<sup>-1</sup> para a triptamina e de 3 à 30 mg.kg<sup>-1</sup> para as demais aminas e demonstrou-se seletivo, específico, linear, preciso, exato e robusto. A fim de garantir a confiança nos resultados foi calculada a incerteza de medição, que é um dos elementos de garantia de qualidade mais importante implantada em um laboratório. O método proposto validado apresentou as características de desempenho necessárias para apresentar resultados confiáveis na determinação de aminas biogênicas em amostras de atum.

**Palavras-chaves:** aminas biogênicas, atum, alimentos, validação de método, incerteza de medição.



## ABSTRACT

Biogenic amines are nitrogen bases of low molecular weight formed by decarboxylation of amino acid precursors. The presence of biogenic amines in foods, the quantitative point of view, is of great importance given that originate by the action of microorganisms and their presence may indicate the degree of product freshness. Therefore are used as quality parameter. Aiming to meet the need of evaluating samples of fish as their quality, we developed a rapid method for simple implementation, using the technique of high performance liquid chromatography analysis of efficiency for biogenic amines. To ensure the quality of the measurement method was validated in the categories: specificity, selectivity, working range, linearity, limit of detection and quantification, accuracy, precision and robustness. The validated method has a total run time of 12 minutes, with complete separation of amines studied: tryptamine, putrescine, cadaverine, histamine, spermidine and spermine. The method proved to be linear in the range of 1.5 to 30 mg.kg<sup>-1</sup> for tryptamine and 3 to 30 mg.kg<sup>-1</sup> for the other amines and demonstrated selective, specific, linear, precise, accurate and robust. In order to ensure confidence in the results was calculated measurement uncertainty, which is one element of quality assurance more important implanted in a laboratory. The proposed method validated showed the performance characteristics necessary to provide reliable results in the determination of biogenic amines in samples of tuna.

**Keywords:** biogenic amines, tuna, food, method validation, measurement uncertainty.



## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das estruturas de algumas aminas biogênicas encontradas em alimentos.....	33
Figura 2 – Reação de descarboxilação da histidina pela histidina descarboxilase e formação da histamina.....	35
Figura 3 – Reação da derivatização das aminas com cloreto de dansila utilizado para determinação de aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência.....	41
Figura 4 – Esquema representativo do diagrama de Ishikawa para identificação das fontes na estimativa da incerteza de medição.....	52
Figura 5 – Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado nas análises de aminas biogênicas.....	62
Figura 6 – Fluxograma das etapas envolvidas no método para determinação de aminas biogênicas.....	64
Figura 7 – Cromatograma representativo das seis aminas analisadas e padrão interno: 1 – triptamina, 2 – putrescina, 3 – cadaverina, 4 – histamina, 6 – espermidina, 7 – espermina e 5 – padrão interno (1,7 diaminoheptano).....	67
Figura 8 – Espectros de absorção de cada analito (triptamina, putrescina, cadaverina, histamina, PI, espermidina, espermina) utilizados na identificação de cada amina no cromatograma.....	68
Figura 9 – Fluxograma das etapas envolvidas na determinação da incerteza de medição.....	75
Figura 10 – Diagrama de Ishikawa para identificação das fontes de incerteza para cada amina.....	77
Figura 11 – Curvas de calibração e equação de regressão construídas em solvente e na matriz na faixa de concentração de 3 a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	81
Figura 12 – Curvas de regressão linear (área x concentração) das aminas: triptamina, putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina na faixa de concentração de 3 a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	84
Figura 13 – Resíduos da regressão das curvas analíticas versus concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) das aminas estudadas.....	86
Figura 14 – Representação gráfica dos efeitos de pequenas variações no método cromatográfico para cada amina analisada.....	94

Figura 15 – Curvas de calibração para quantificação das aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de atum.....96

Figura 16 – Contribuições de cada fonte: repetitividade, curva analítica, padrão, diluições e pesagens na estimativa da incerteza de medição de cada amina.....101



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valor do fator de abrangência (k) em função do valor de graus de liberdade efetivo ( $V_{eff}$ ) considerando nível de confiança de 95,5% para cálculos da estimativa da incerteza de medição em medições químicas.....	57
Tabela 2 – Gradiente de eluição dos componentes da fase móvel água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) utilizados na determinação de amins biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência.....	66
Tabela 3 – Gradiente do fluxo da fase móvel empregado na determinação de amins biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência.....	66
Tabela 4 – Parâmetros de avaliação da especificidade do método..	70
Tabela 5 – Variações nas condições analíticas para avaliação da robustez do método.....	75
Tabela 6 – Identificação de cada fonte de entrada e o tipo de distribuição utilizado no cálculo de incerteza de medição.....	78
Tabela 7 – Valores obtidos no teste F de Snedecor para avaliação de igualdade de variâncias entre a curva de calibração em solvente e na matriz.....	82
Tabela 8 – Resultados referentes aos parâmetros cromatográficos utilizados para avaliação da especificidade do método de determinação de amins biogênicas.....	83
Tabela 9 – Valores de Cochran calculados e tabelados para cada amina em um intervalo de confiança de 95%.....	85
Tabela 10 – Porcentagem de recuperação das amins em amostras fortificadas nas concentrações de 1,5 a 30 mg.kg <sup>-1</sup> para triptamina e de 3,0 a 30 mg.kg <sup>-1</sup> para as demais amins estudadas.....	88
Tabela 11 – Médias das áreas das triplicatas, desvio padrão e desvio padrão relativo dos ensaios de repetitividade.....	89
Tabela 12 – Médias das áreas das triplicatas, desvio padrão e desvio padrão relativo dos ensaios de precisão intermediária.....	91
Tabela 13 – Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação da precisão intermediária.....	92

Tabela 14 – Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) calculados para cada amina.....	93
Tabela 15 – Teores das aminas biogênicas encontradas em amostras de atum conservadas em salmoura e em gelo nas embarcações.....	98
Tabela 16 – Resultados da incerteza combinada e expandida associada a cada amina estudada.....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas  
ANOVA – Análise de Variância  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
BIPM - Bureau International des Poids et Mesures  
BPF – Boas práticas de fabricação  
CAD - Cadaverina  
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
DAD – Detector de Arranjo de diodos (do inglês, *diode array detector*)  
DIN - Deutsche Industrie Normen  
DP – Desvio padrão  
FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação  
FDA – *Food and Drug Administration*  
g - grama  
HIS - Histamina  
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IEC - Comissão Eletrotécnica Internacional (do inglês, International Electrotechnical Commission)  
IFCC - *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*  
IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*)  
Kg - quilograma  
L – litro  
LANARA – Laboratório Nacional de Referência Animal  
LD – limite de detecção  
LGC – *Guide for Chemical Laboratories*  
LQ – limite de quantificação  
MRC – Material de Referência Certificado  
mL - mililitro  
m/v – massa/volume  
ND – Não detectado  
NIST - *National Institute of Standards and Technology*  
OIML – Organização Internacional de Metrologia Legal  
OPA – orto-ftalaldeído  
PI – padrão interno  
PUT – Putrescina  
qsp. – Quantidade suficiente para

$R^2$  – coeficiente de determinação  
RBC – Rede Brasileira de Calibração  
rpm – rotações por minuto  
RSD – Desvio padrão relativo  
SI – Sistema Internacional  
SEAP – Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca  
SPD - Espermidina  
SPM - Espermina  
TCA – Ácido tricloroacético  
TRYP – Triptamina  
UV/Vis – Ultravioleta visível  
 $V_{\text{eff}}$  – graus de liberdade efetivo  
 $\mu\text{g}$  - micrograma

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>29</b>
2.1 – PESCADO.....	29
2.2.1 – Formação da histamina.....	34
2.2.2 – Toxicidade das aminas biogênicas .....	36
2.2.3 – Legislação .....	37
2.3 - DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS .....	38
2.3.1 – Métodos para Determinação de aminas biogênicas.....	38
2.3.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	39
2.3.2.1 – Extração.....	39
2.3.2.2 – Derivatização.....	40
2.3.2.3 – Separação .....	41
2.3.2.4 – Detecção .....	42
2.3.2.5 – Quantificação .....	42
2.4 – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS.....	43
2.4.1 – Parâmetros de validação.....	45
2.4.1.1 – Especificidade e Seletividade .....	45
2.4.1.2 – Faixa de trabalho .....	46
2.4.1.3 – Linearidade.....	46
2.4.1.4 – Sensibilidade .....	47
2.4.1.5 – Exatidão e Tendência .....	47
2.4.1.5.1 – <i>Material de Referência Certificado (MRC)</i> .....	47
2.4.1.5.2 – <i>Recuperação</i> .....	48
2.4.1.6 – Precisão .....	48
2.4.1.6.1 – <i>Repetitividade</i> .....	49
2.4.1.6.2 – <i>Reprodutibilidade</i> .....	49
2.4.1.6.3 – <i>Precisão intermediária</i> .....	49
2.4.1.7 – Limite de detecção .....	49
2.4.1.8 – Limite de Quantificação .....	50
2.4.1.9 – Robustez .....	50
2.5 – INCERTEZA DE MEDIÇÃO.....	50

2.5.1 – Etapas da Estimativa de incerteza .....	52
2.5.1.1 – Especificação do mensurando .....	52
2.5.1.2 – Identificação das fontes de incerteza.....	52
2.5.1.3 – Quantificar os componentes de incerteza.....	53
2.5.1.4 - Calculo da incerteza.....	53
2.5.1.4.1 – <i>Incerteza do tipo A</i> .....	54
2.5.1.4.2 – <i>Incerteza do tipo B</i> .....	54
2.5.1.4.3 – <i>Incerteza combinada</i> .....	54
2.5.1.4.4 – <i>Incerteza expandida</i> .....	55
2.5.2 – Erro e incerteza .....	57
2.5.2.1 – Erros sistemáticos .....	58
2.5.2.2 – Erros aleatórios .....	58
<b>3 – OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
3.1 – OBJETIVO GERAL .....	59
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
<b>4 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
4.1 – MATERIAL .....	61
4.1.1 – Amostras de atum.....	61
4.1.2– REAGENTES UTILIZADOS NAS ANÁLISES .....	61
4.1.3 – Vidrarias e Instrumentos .....	61
4.1.4 – Equipamento .....	61
4.1.5 – Preparo das soluções .....	62
4.1.5.1 – Solução padrão de aminas .....	62
4.1.5.2 – Solução padrão interno.....	63
4.1.5.3 – Solução derivatizante .....	63
4.1.5.4 – Solução L- prolina.....	63
4.1.5.5 – Solvente extrator .....	63
4.2 – MÉTODOS .....	63
4.2.1 – DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS.....	63
4.2.1.1 – Preparo da amostra.....	64
4.2.1.2 – Extração .....	64
4.2.1.3 – Derivatização .....	65
4.2.1.4 – Injeção.....	65

4.2.1.5 – Separação .....	65
4.2.1.6 – Detecção, identificação e quantificação .....	66
4.2.4.1 – Especificação do mensurando .....	76
4.2.4.2 – Identificação das fontes de incerteza .....	76
4.2.4.3 – Quantificação das fontes de incerteza .....	79
4.2.4.4 – Cálculo da incerteza combinada .....	79
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
5.1 – PARÂMETROS ANALÍTICOS DE VALIDAÇÃO .....	81
5.1.1 – Seletividade .....	81
5.1.2 – Especificidade .....	83
5.1.3 – Linearidade .....	83
5.1.3.1 – Resíduos .....	85
5.1.4 – Exatidão e tendências .....	87
5.1.4.1 – Recuperação .....	87
5.1.5 – Precisão .....	89
5.1.5.1 – Repetitividade .....	89
5.1.5.2 – Precisão intermediária .....	91
5.1.6 – Limite de Detecção (LD) e Limite de quantificação .....	92
5.1.7 – Robustez .....	93
5.2 – DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE ATUM PROVENIENTES DO SISTEMA DE CONSERVAÇÃO EM GELO E EM SALMOURA .....	95
5.3 – ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO ASSOCIADA AO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS .....	99
<b>6 – CONCLUSÃO .....</b>	<b>103</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS .....</b>	<b>105</b>
<b>8 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>123</b>





## 1 – INTRODUÇÃO

Anualmente, mais de 63,5 milhões de toneladas de pescados são capturados, representando um aumento global em seu consumo (SILVA et al., 2011).

O segmento da pesca industrial no Brasil é de grande relevância social e econômica para muitos municípios litorâneos. Trata-se de uma atividade de base, fornecedora de matéria prima para as grandes indústrias de centros de distribuição de alimentos. A pesca industrial no Brasil é responsável pelo desembarque de metade da produção de pescados de origem marinha. Apesar da vasta extensão da costa brasileira, as condições naturais do nosso litoral sempre foram limitantes para o desenvolvimento de uma frota pesqueira industrial massiva. Atualmente a pesca de atuns e afins é regulamentada pela Comissão Internacional para a Conservação do Atum Atlântico – ICCAT, do qual o Brasil é signatário, por meio da alocação de cotas de captura aos países (MPA, 2011).

Segundo informações estatísticas obtidas com o apoio do IBGE e do IBAMA, em 2009, o Estado de Santa Catarina foi o maior produtor nacional de pescados com 207 mil toneladas/ano (MPA, 2010). O Estado é o quinto maior exportador de pescados do Brasil, ficando atrás somente do Ceará, que detém os maiores números em exportações, Pará, Rio Grande do Norte e Pernambuco (IBAMA, 2006).

A pesca do atum e de outros peixes de profundidade é um dos focos dos programas governamentais de incentivo à pesca sendo que ele representa um dos principais recursos pesqueiros da zona econômica exclusiva brasileira. Em 2005, a produção de atuns e afins no país chegou a 46.000 toneladas, com uma receita de 24 milhões de reais em exportações. A espécie é importante na geração de empregos na indústria pesqueira e na pesca artesanal, principalmente nos estados do Nordeste, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Santa Catarina (SEAP, 2009).

A aquicultura brasileira tem também se destacado nas exportações, com aumento para peixes frescos principalmente na forma de filés (FAO, 2008). Além disso, verificou-se uma valorização do preço de pescado exportado pelo Brasil, gerado diretamente pelas crescentes exportações de preparações e conservas, filé de peixe, lagosta, polvo, atuns e afins (SEAP, 2009).

O peixe constitui uma fonte abundante de proteína de alta qualidade, vitaminas A, D, E e do complexo B além de certos minerais, dentre eles cálcio, fósforo e ferro. Em sua fração lipídica os peixes contêm ainda ácidos graxos ômega-3 conhecidos por sua ação protetora

contra doenças do coração e inflamatórias (BAYLISS, 1996; BELINSKY et al., 1996; MÉNDEZ et al., 1996, SILVA et al., 2011). Entretanto, o peixe é altamente susceptível à deterioração (SASSAKI e RIBEIRO, 1991; ASHIE et al., 1996; VIEIRA, 2004), e assim, à formação de aminas biogênicas, dentre elas, a histamina (TAYLOR, 1990; RODRIGUEZ-JÉREZ et al., 1994).

As aminas biogênicas são substâncias biologicamente ativas que podem causar doenças em homens e animais através da sua ingestão. As aminas biogênicas mais importantes por sua ocorrência em alimentos são a histamina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina,  $\beta$ -fenilalanina, espermina e espermidina. Dentre os alimentos que possam vir a conter teores consideráveis de aminas biogênicas estão os peixes, produtos cárneos, ovos, queijos vegetais fermentados e ainda algumas bebidas como o vinho (SHALABY, 1996).

A histamina é a amina biogênica que mais provoca efeitos toxicológicos no corpo (SHALABY, 1996), porém a presença de outras aminas biogênicas, tais como putrescina e cadaverina podem potencializar o efeito tóxico da histamina atuando como sinergistas (SMITH, 1980; SHAKILA, VIJAYAKSHIMI e JEYASEKARAM, 2003).

A histamina [4-(2aminoetil)imidazol] é uma diamina biogênica primária e heterocíclica, não volátil, termoestável originada principalmente através da descarboxilação da L-histidina quando as condições de manuseio e estocagem são inadequadas, favorecendo, portanto, a multiplicação de bactérias que produzem a enzima histidina descarboxilase (OLIVEIRA et al., 2004). Bactérias como *Morganella morganii*, *Hafnia aalvei*, *Proteus* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., entre outras, são capazes de produzir a enzima histidina descarboxilase que, ao atuar sobre a histidina livre, transformam-a em histamina.

As aminas biogênicas podem ser usadas para estimar o grau de frescor ou deterioração dos pescados, pois são encontradas em baixos níveis no pescado fresco e sua presença pode estar relacionada com a deterioração bacteriana (VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL CAROU, 1997). Veciana-Nogués; Mariné-Font; Vidal Carou (1997a) sugeriram o monitoramento do conteúdo de histamina, tiramina, cadaverina e putrescina para avaliar o grau de deterioração dos pescados.

O teor de histamina encontrados em alguns alimentos tem implicação direta com as boas práticas de fabricação e com o estado de preservação de alguns alimentos tornando sua presença um potencial problema de saúde pública. As bactérias produtoras de aminas

biogênicas não fazem parte da microbiota normal intestinal, da pele ou brânquias dos peixes marinhos recém-capturados, na maioria dos casos, originam-se a partir da contaminação por práticas inadequadas de higiene durante o processo de captura ou podem ainda estar associada ao ambiente marinho. O método de captura tem influência acentuada com relação ao intervalo de tempo necessário para que o *rigor mortis* se instale. Os peixes que possuem hábitos ativos, como por exemplo, os atuns, podem debater-se muito antes de sua morte, prejudicando a qualidade e diminuindo o tempo de estocagem no gelo ((FRATTINI e LIONETTI, 1998; CINQUINA et al., 2004; VIEIRA, 2004).

Desse modo, é possível afirmar que a presença de histamina é um indicador da falta de qualidade bacteriológica. Quando o pescado, após-captura, é mantido em temperaturas que favoreçam o crescimento bacteriano, inicia-se um processo de degradação proteica com formação de histamina e outras aminas (SHALABY, 1996; TAHMOUZI; KHAKSAR; GHASEMLOU, 2011).

O aminoácido histidina, que é precursor da histamina, está presente em maior quantidade em determinadas espécies de pescados, como o atum, a cavalinha o arenque e outros representantes das famílias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pamatomidae* e *Scombrisosidae* (TAYLOR, 1986; LEHANE e OLLEY, 2000).

A garantia da qualidade analítica é um conjunto completo de medidas que um laboratório deve assegurar para obter dados de alta qualidade. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis sobre a amostra ele deve passar por um processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que o método e o sistema são adequados para o uso desejado (RIBANI et al., 2004).

Em qualquer processo de medição de uma grandeza, o resultado será uma estimativa do valor verdadeiro dessa grandeza, logo uma indicação quantitativa referente às parcelas de dúvida embutidas nesta estimativa é necessária para avaliar a qualidade da medição. Para quantificar todas essas parcelas e garantir um nível de confiança ao resultado é necessário calcular a incerteza de medição (EURACHEM, 2002).

Neste contexto, a quantificação de aminas biogênicas demonstra-se de suma importância na avaliação da qualidade do pescado. Para obtenção de resultados confiáveis o método deve ser validado nos quesitos exigidos e ainda para demonstrar um maior nível de confiança pode-se calcular a incerteza de medição do método utilizado. Buscando atender a demanda por este tipo de análise e como

requisito de garantia da qualidade em medições analíticas, este trabalho propõe o desenvolvimento, validação e incerteza de medição de um método para determinação de aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência e sua aplicação em matrizes de atum. Com o método proposto também busca-se diminuir o tempo operacional e os custos da análise.

## **2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 – PESCADO**

O peixe apresenta importantes características nutricionais, constituindo uma excelente fonte de proteínas, de lipídios, de vitaminas e de sais minerais. Além do valor nutricional, trata-se de um alimento que, de um modo geral, é de fácil digestão e com baixos níveis de colesterol. O seu consumo é uma forma muito efetiva de suprir os aminoácidos requeridos pelo homem. O atum, entre outras espécies de pescados, se caracteriza por conter proteínas de excelente qualidade cujos aminoácidos, em sua maior parte, são essenciais para a alimentação humana (USYDUS et al., 2009).

No pescado fresco, a qualidade é facilmente avaliada pelas características sensoriais. O peixe fresco deve apresentar-se íntegro, com odor e sabor próprios, lembrando o de plantas marinhas; olhos vivos e destacados, escamas brilhantes e bem aderentes à pele; curvatura natural do corpo; nadadeiras apresentando certa resistência aos movimentos provocados; carne firme, de consistência elástica e cor própria da espécie; vísceras integras e perfeitamente diferenciadas; e a musculatura da parede intestinal não deve apresentar sinais de autólise (LANARA, 1981; NISHIKAWA e ARANHA, 1988). Com o processo de deterioração, o pescado vai perdendo suas propriedades sensoriais, apresentando escamas opacas que se soltam facilmente, olhos turvos com pupilas branco leitosas; guelras pálidas ou escuras; carne amolecida, cinzenta, sem brilho e sem elasticidade; cheiro desagradável de amônia, tornando-o impróprio para o consumo (NUNES, 1994).

O fato de o pescado ser um produto altamente perecível exige muitos cuidados em relação ao seu manuseio, tanto durante o processo de captura quanto durante a estocagem em urnas isotérmicas ou câmaras frigoríficas localizadas nos barcos pesqueiros (VIEIRA, 2004).

A alta perecibilidade do pescado é explicada por sua grande susceptibilidade às alterações provocadas por enzimas autolíticas e pela ação de micro-organismos (BERAQUET e LINDO, 1985). A elevada atividade de água nos tecidos, a presença de lipídios insaturados e a ação destrutivas das enzimas naturalmente presentes nos tecidos também contribuem para a rápida deterioração do pescado (AGNESE et al., 2001; PACHECO et al., 2004; SOARES et al., 1998).

As primeiras transformações que o pescado sofre após a despesca estão associadas à degradação de ATP e consequente

instalação do “*rigor mortis*”. Na condição de anaerobiose que prevalece durante o “*rigor mortis*” ocorre a formação de ácido láctico diminuindo os valores de pH de 7,0 para aproximadamente 6,5 - 6,0. A velocidade em que ocorre a diminuição do pH depende das condições da pesca, pois as reservas de glicogênio são dependentes da resistência que o peixe se opõe à captura. Quando o pescado é submetido a um forte estresse durante o processo de captura, terá um período de “*rigor mortis*” bem reduzido devido ao gasto excessivo de glicogênio. Os peixes de hábitos ativos como o atum e a cavala podem debater-se muito antes de sua morte, quando capturados por redes ou anzóis, prejudicando assim a qualidade do músculo provocando a diminuição do tempo de estocagem em gelo (BERAQUET e LINDO, 1985; KAI e MORAIS, 1988; VIEIRA, 2004).

A autólise causa profundas mudanças estruturais no músculo do pescado tornando-o mais mole, e com a quebra dos tecidos conectivos, afastando-o dos ossos. No entanto, do ponto de vista da deterioração, é importante ressaltar que o amolecimento do tecido muscular facilita a penetração de micro-organismos e os produtos da degradação por autólise formam o substrato ideal para o desenvolvimento de bactérias que causam a deterioração do pescado (BERAQUET e LINDO, 1985).

O músculo inicial do pescado vivo ou recém capturado é normalmente estéril, embora haja um grande número de bactérias presentes no muco da camada superficial, nas guelras, e principalmente, no trato intestinal. A microbiota natural é composta principalmente de bactérias psicrofílicas e psicrotróficas gram-negativas, destacando-se *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium*. O peixe capturado em áreas tropicais pode transportar uma carga ligeiramente maior de micro-organismos gram-positivos e bactérias entéricas (BERAQUET e LINDO, 1985; KAI e MORAIS, 1988; FAO, 2009).

A qualidade e inocuidade do pescado estão relacionadas com a contaminação por metais pesados, deterioração do pescado pela ação de micro-organismos ou de enzimas endógenas, toxinas, aminas biogênicas, química, oxidativa e autolítica, possíveis alterações sensoriais e presença de parasitos (OLSON, 1987; GRAM; WEDELL-NEERGAARD; HUSS, 1990; GERMANO; OLIVEIRA; GERMANO, 1993; GRAM e HUSS, 1996; GERMANO e GERMANO, 1998; HUSS; ABABOUC; GRAM, 2004).

Sendo altamente perecível, o pescado exige cuidados especiais para que as suas características microbiológicas, sensoriais, físico-

químicas e nutricionais permaneçam viáveis ao consumo (SILVA e CARVALHO, 2006).

As práticas sanitárias permeiam todos os fatores relativos à contaminação dos alimentos marinhos, incluindo o meio em que esses organismos são capturados, a manipulação da matéria-prima fresca e o estado das instalações onde o pescado é processado e armazenado (GANOWIAK, 1994). A eficácia das medidas sanitárias depende da seriedade com que o profissional envolvido cumpre as normas estabelecidas para melhorar a qualidade e aumentar a confiabilidade sanitária dos produtos. As Boas Práticas de Fabricação (BPF) se baseiam em uma série de procedimentos que garantem as condições higiênicas e sanitárias ideais ao alimento (BRASIL, 2004), e envolvem higiene do manipulador, da instalação e utensílios; uso de gelo de qualidade e em quantidade adequada; controle de tempo e temperatura de manuseio, armazenamento e transporte; controle de pragas, animais domésticos e contaminantes, entre outros (CODEX, 2003).

Geralmente a prática da pesca envolve a manipulação do pescado a bordo e seu método de preservação no interior da embarcação. O controle de temperatura durante as etapas de produção, e distribuição dos alimentos ao consumo é um dos fatores mais importantes na garantia da qualidade dos produtos processados (BRAMORSKI et al., 2005). Quando mantido em temperaturas superiores a 4°C pode sofrer sérias consequências em sua qualidade. (TAYLOR, 1986; PRICE, 1999). É imprescindível conservar o pescado em temperaturas baixas, reduzindo a proliferação de micro-organismos e preservando as suas características sensoriais e nutricionais (AGNESE et al., 2001; PIMENTEL e PANETTA, 2003).

A operação mais crítica na manipulação do pescado é conseguir um resfriamento rápido. A conservação de peixe no gelo tem sido usada para elevar a vida útil deste alimento (GASPAR et al., 1997; LIRA; PEREIRA; ATHAYDE, 2001; LIMA, 2003). De acordo com VIEIRA et al. (2004), o gelo utilizado na conservação do pescado deverá ser de ótima qualidade em relação ao seu aspecto bacteriológico, pois a qualidade deste afetará diretamente a qualidade do pescado.

Outra forma de conservação do pescado no interior da embarcação é armazená-los em tanques salmourados. Com essa técnica o pescado é congelado mais rapidamente do que nas embarcações que utilizam gelo. Segundo Henry e Koheler (1986), a concentração de cloreto de sódio influencia o metabolismo bacteriano e gera progressiva alteração nas membranas.

## 2.2 – AMINAS BIOGÊNICAS

Aminas biogênicas, ou bioaminas, são bases nitrogenadas de baixa massa molecular formadas por descarboxilação de aminoácidos ou por aminação ou desaminação de aldeídos e cetonas. A descarboxilação microbiana de aminoácidos livres específicos é o mais comum modo de formação de aminas biogênicas em alimentos e bebidas (SILLA-SANTOS, 1996; LAPA GUIMARÃES e PICKOVA, 2004; LAPA-GUIMARÃES, 2005; AWAN; FLEET; THOMAS, 2008).

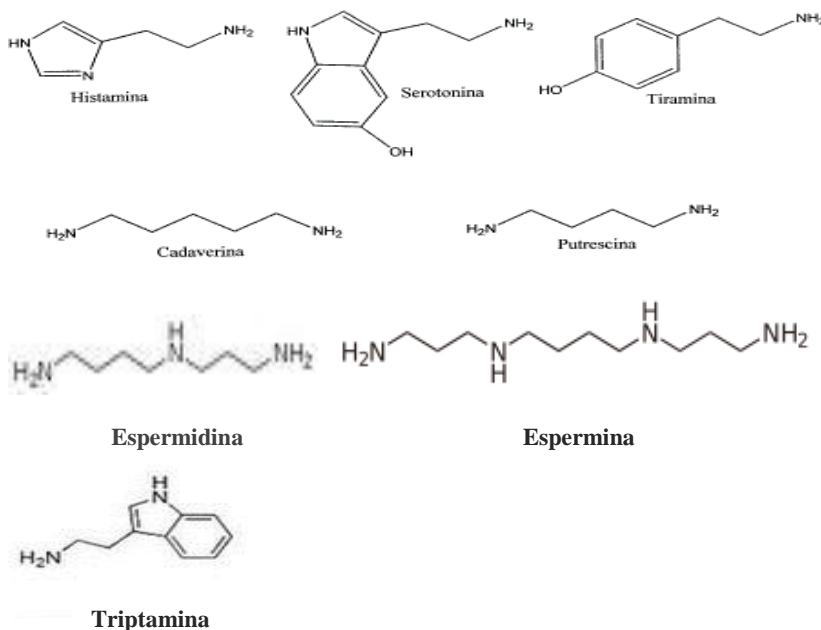
Segundo Shalaby (1996), as aminas biogênicas são fatores antinutricionais naturais e possuem a habilidade de iniciar várias reações farmacológicas.

Elas são sintetizadas por animais, plantas e micro-organismos e em mamíferos podem ser sintetizadas endogenamente por rotas metabólicas que usualmente envolvem descarboxilação de aminoácidos precursores, ou ainda, similarmente, elas podem ser geradas exogenamente no trato intestinal por descarboxilação bacteriana de aminoácidos liberados por hidrólise enzimática de proteínas da dieta (SMITH, 1981; PINEDA et al., 2012).

As aminas biogênicas (Figura 1) podem ser classificadas de acordo com os grupos amínicos em monoaminas: tiramina e fenilalanina; diaminas: histamina, serotonina, triptamina, putrescina, cadaverina e poliaminas: putrescina, espermina e espermidina (GIROTTO; MASSON; HARACEMIV, 2010). E quanto à sua estrutura química também podem ser divididas em três grupos distintos. O primeiro grupo é o das aminas alifáticas, o qual engloba a cadaverina, espermina e espermidina; a tiramina e feniletilamina são classificadas como aminas aromáticas e o grupo das aminas aromáticas heterocíclicas compreendem a histamina e triptamina (SILLA-SANTOS, 1996; SAAID et al., 2009).



**Figura 1** – Representação das estruturas de algumas amins biogênicas encontradas em alimentos.



Vários tipos de alimentos podem conter amins biogênicas, tais como: peixes, carnes, embutidos fermentados, ovos, queijos, vegetais fermentados, produtos com soja e algumas bebidas como cerveja e vinhos (SHALABY, 1996; SILLA-SANTOS, 1996; KALAC<sup>~</sup>; ŠVECOVA; PELIKANOVA, 2002; KVASNICKA e VOLDRICH, 2006; VITALI et al., 2013).

As amins biogênicas nos alimentos geralmente são provenientes de aminoácidos precursores, como por exemplo, a histamina, tiramina e triptamina, originam-se da histidina, tirosina, e triptofano respectivamente. A cadaverina e a putrescina recebem esse nome, pois foram primeiramente encontradas em produtos já em estado de decomposição e putrefação. E por último, a espermina e a espermidina, assim chamadas, pelo fato de terem sido isoladas pela primeira vez no fluido seminal (GLÓRIA, 2005).

Na formação das amins biogênicas, um grupamento carboxílico é removido do aminoácido precursor para dar origem a

amina correspondente. A arginina é facilmente convertida para agmatina e como resultado da atividade bacteriana a agmatina poderá ser convertida à putrescina. A lisina pode ser convertida por ação bacteriana para cadaverina. A histidina é convertida à histamina. A tiramina, triptamina e  $\beta$ -fenilalanina são originadas do mesmo modo a partir da tirosina, triptofano e fenilalanina, respectivamente. A proteólise, ou autólise bacteriana desempenham papel importante na liberação de aminoácidos livres de proteínas do tecido, que oferecem um substrato para descarboxilases. Dois mecanismos de ação para a descarboxilação de aminoácidos, uma reação piridoxal dependente de fosfato e uma reação não piridoxal também dependente de fosfato. O fosfato pode catalisar muitas reações de aminoácidos (ENTENMILLER e SOUZA, 1984).

A presença de aminas biogênicas em alimentos, em especial a histamina, é um típico indicador de deterioração e seus limites são bem estabelecidos em vários regulamentos para diferentes tipos de alimentos (PINEDA et al., 2012).

As aminas podem ser empregadas como parâmetro ou critério de qualidade (DONHAUSER, WAGNER, GEIGER, 1993), refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênicas inadequadas prevalentes durante a produção, processamento e armazenamento de certos produtos (TAYLOR, 1986; VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL-CAROU, 1997). Uma vantagem do uso de aminas como critério de qualidade reside no fato destas serem termoresistentes, permanecendo no alimento mesmo após tratamento térmico (LIMA e GLÓRIA, 1999).

A análise de aminas biogênicas esta focada em sua toxicidade e seu uso como indicador de decréscimo no frescor ou deterioração de alimentos. A aplicação da análise de aminas biogênicas se apresenta como importante ferramenta no controle de qualidade de matéria prima, produtos intermediários e produtos finais, e ainda no controle de processos (PARK et al., 2010).

### ***2.2.1 – Formação da histamina***

O aminoácido histidina sofre descarboxilação (Figura 2) no organismo através da enzima histidina descarboxilase, dando origem a uma amina primária chamada histamina (XAVIER; RIGHI; BERNARDI, 2007). Quimicamente a histamina é uma molécula hidrofílica envolvendo um anel imidazólico e um grupamento amino

conectado por dois grupamentos metileno (JUNIOR e SERAFIN *apud* GOODMAN e GILMAN, 1997).

Figura 2 – Reação de descarboxilação da histidina pela histidina descarboxilase e formação da histamina.



Fonte: (LEHNINGER et al., 1993).

A quantidade e o tipo de aminas biogênicas formadas é fortemente influenciada pela composição bioquímica dos alimentos – viabilidade dos aminoácidos presentes, da microbiota e por outros parâmetros que permitem a multiplicação bacteriana durante o processamento e armazenamento dos alimentos (DRAISCI et al., 1998; CARELLI et al., 2007).

A manipulação do pescado fora das condições ideais de refrigeração permite que bactérias contaminantes consigam se multiplicar e promover a descarboxilação da histidina em histamina, pois em seu crescimento, algumas bactérias produzem a enzima histidina descarboxilase. (FDA, 2001; XAVIER; RIGHI; BERNARDI, 2007). Segundo FDA (2001), a histamina é formada em consequência do abuso do binômio tempo/temperatura em determinadas espécies de pescado, ou seja, quando o pescado é exposto a altas temperaturas por muito tempo.

Embora aminas sejam usualmente formadas durante a decomposição e deterioração, processos envolvendo a formação de aminoácidos livres até completa proteólise juntamente com a produção bacteriana e ação dos aminoácidos descarboxilases podem produzir altos níveis de histamina até mesmo antes que o alimento apresente outras características típicas de deterioração ou apresentar-se sensorialmente inaceitável (SHALABY, 1996). Contudo, a presença de histamina pode ser um bom indicador de que a decomposição está se estabelecendo no músculo do peixe, porém deve-se observar que isso pode ser extremamente variável. A produção de histamina está diretamente ligada com a espécie do peixe e o peixe individualmente, a parte do peixe amostrada, o tempo

e temperatura de armazenamento e tipo e número de micro-organismos (LEHANE e OLLEY, 2000).

Parte da histamina provém da autólise provocada por micro-organismos, principalmente da família das enterobactérias (HERRERO 2001). Bactérias como *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Proteus sp*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, são capazes de produzir a enzima histidina descarboxilase que, ao atuar sobre a histidina livre, transformam-a em histamina (DO CARMO et al., 2010). Shin-Hee et al. (2001), relata que a *Morganella morganii* é a bactéria com o maior potencial de formação da histamina, seguida pelo *Proteus vulgaris* (PROCÓPIO, 2000; FDA, 2001).

### 2.2.2 – Toxicidade das aminas biogênicas

O conteúdo de aminas biogênicas é estudado em diversos alimentos devido ao seu grande potencial de toxicidade (ONAL, 2007).

A histamina é a mais tóxica amina detectada em alimentos como peixes, queijos, vinhos e produtos cárneos. O seu efeito toxicológico depende de vários fatores, tais como sua concentração, da atividade da amino-oxidase e da fisiologia intestinal do indivíduo (SILLA-SANTOS, 1996). Outras aminas biogênicas, como a tiramina, triptamina,  $\beta$ -fenilalanina, espermidina, espermina, podem agir potencializando a toxicidade da histamina (SHALABY, 1996).

Os peixes mais comumente envolvidos em episódios de intoxicação histamínica são os da família *Scombridae* e *Scomberesocidae*, porém alguns não *Scombroideae* também podem estar envolvidos em alguns episódios, essas espécies são caracterizadas por apresentarem em sua composição níveis elevados de histidina (TAYLOR, 1986 *apud* LEHANE e OLLEY, 2000; OLIVEIRA, et al, 2012). Alguns exemplos de peixes da família *Scombroideae* que estão mais envolvidos em casos de intoxicação são o atum, o bonito e cavalinha (CHANG et al., 2008).

A histamina exerce sua toxicidade por interagir em locais específicos na membrana celular chamados de receptores histamínicos  $H_1$ ,  $H_2$  e  $H_3$ . Os sintomas mais comuns resultantes de sua ação são observados no sistema cardiovascular. A histamina causa dilatação nos vasos sanguíneos periféricos causando urticária, hipotensão, dores de cabeça, palpitação. Em casos mais severos podem ocorrer broncoespasmos, sufocamento e desordem respiratória severa. A histamina provoca também sintomas gastrointestinais por agir sobre a musculatura lisa do intestino causando dores abdominais, diarreia e

vômitos. Dor e coceira associadas com urticárias também podem ocorrer e são devidas à estimulação sensorial e motora (LEHANE e OLLEY, 2000; SHALABY, 1996).

A histamina é associada à diversos surtos de intoxicação alimentar. As faixas de concentração em que se encontra nos alimentos estão diretamente associadas aos sintomas causados. A faixa de concentração de  $8 \text{ mg.kg}^{-1}$  –  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  pode causar sintomas leves, a faixa de  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  –  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  pode causar sintomas moderados e acima de  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  os sintomas já são considerados intensos (PARENTE et al., 2001). Shalaby (1996) em sua revisão baseada em dados envolvendo episódio de intoxicação sugeriu a seguinte classificação: alimentos com níveis de histamina menores que  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  são seguros para consumo; níveis de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  a  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  podem ser possivelmente tóxicos, alimentos com teores de  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$  à  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  provavelmente serão tóxicos e acima de  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  são tóxicos e inseguros para o consumo humano. A putrescina, cadaverina, espermidina e espermina não causam efeitos tóxicos, porém elas podem potencializar o efeito tóxico provocado pela histamina e tiramina, pois elas competem pelas mesmas enzimas detoxificantes e ainda, em produtos cárneos, podem reagir com nitrito favorecendo a formação de nitrosaminas que são compostos carcinogênicos. Portanto torna-se importante sua avaliação em produtos cárneos já que estes geralmente sofrem a adição de sais de cura contendo nitrito e nitrato (EEROLA et al., 1993; HERNANDEZ-JOVER et al., 1997). A triptamina também pode causar aumento da pressão arterial (SHALABY, 1996).

A intoxicação alimentar causados pelas aminas biogênicas pode ocorrer especialmente quando esta está presente concomitantemente com alguns fatores tais como uso de inibidores da monoamina oxidase, uso de drogas, álcool e doenças gastrointestinais (MARINE-FOUNT et al., 2005).

A intoxicação causada pela histamina muitas vezes é confundida com a intoxicação por *salmonella* ou por alergia alimentar. Porém dependendo da susceptibilidade do indivíduo os sintomas clínicos podem ser bem mais severos, por exemplo em indivíduos que fazem uso de medicamentos como isoniazida o qual inibe as enzimas detoxificante no intestino (LEHANE e OLLEY, 2000).

### 2.2.3 – Legislação

No Brasil, assim como nos demais países do Mercosul, o nível máximo permitido de histamina é de  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . O Canadá e Suíça

também adotam este limite (BRASIL, 1997; HU; XIA; LIU, 2007). O Conselho Directivo da União Europeia também estabelece o limite de histamina para pescados. Nove amostras de cada lote são requeridas para análise, destas nove amostras é estabelecido que a média não ultrapasse  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ , duas amostras podem ter valores maiores que  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  porém, menores que  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  e que nenhuma exceda o limite de  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Ainda estabelece que as análises sejam feitas em CLAE (CE, 1991).

A Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos estabeleceu para peixes susceptíveis de formação de histamina o limite de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  para o produto no porto e de  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  de produto em conserva (VITALI et al, 2013). A FDA também admite como peixe de boa qualidade os que contêm níveis de histamina inferiores a  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  (FDA, 2001).

### 2.3 - DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS

A determinação de aminas biogênicas em alimentos torna-se importante por duas razões: A primeira é devido ao seu potencial de toxicidade e a segunda é pela possibilidade de usá-las como marcadores de qualidade do alimento. As principais aplicações da análise de aminas biogênicas é no controle de qualidade da matéria-prima, produtos intermediários e produto acabado, monitoramento de processos fermentativos e controle de processos nas indústrias de alimentos. Portanto a avaliação e quantificação das aminas biogênicas tornam-se importantes não somente pelo ponto de vista toxicológico, mas também como indicativo de decréscimo de frescor, e degradação de produtos (SILLA SANTOS; 1996 ONAL, 2007).

#### 2.3.1 – Métodos para Determinação de aminas biogênicas

Um grande número de métodos de separação tem sido descritos para determinação de aminas biogênicas (VITALI et al., 2013). Dentre eles estão, principalmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (MORET e CONTE, 1996; FRATTINI e LIONETTI, 1998; TASSONI; GERMANÁ; BAGNI, 2004; OLIVEIRA et al., 2004), a cromatografia gasosa (AWAN et al., 2008; AVELAR; FRANÇA; FERRAZ, 2005; HWANG; WANG; CHONG, 2003), a eletroforese capilar (PAPROSKI et al., 2002; KOVÁCS; SIMON-SARKADI; GANZLER 1999; VITALI et al., 2013). Vários trabalhos publicados utilizam-se da comparação entre métodos para avaliar o que melhor se aplica para análise de aminas

biogênicas (CINQUINA et al., 2004; LANGE; THOMAS; WITTMAN, 2002; ALBERTO et al., 2002; ÖNAL, 2007 ). Outros trabalhos ainda comparam algumas modalidades na análise como a fase de extração das aminas biogênicas (GLORIA e SOARES, 1993; CUSTÓDIO; TAVARES; GLÓRIA, 2007; MORET e LANFRANCO, 1996), os compostos utilizados na derivatização (ÖNAL, 2007) e ainda as variações em sistemas de detecção (ÖNAL, 2007). A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência ainda é a mais popular e a mais frequentemente utilizada para determinação de aminas biogênicas (SAAID et al., 2009).

### ***2.3.2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)***

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais utilizada dentre todas as técnicas de separação analítica. A razão para essa popularidade do método é a sensibilidade, adaptabilidade para determinações quantitativas, adequação para separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e acima de tudo, sua aplicabilidade generalizada para substâncias que são de interesse primordial para a indústria e para muitos campos da ciência (SKOOG, 1998).

A CLAE utiliza pressões elevadas para forçar a passagem do solvente através de colunas que contêm partículas muito finas, capazes de proporcionar separações com alta resolução. Os dispositivos para CLAE consistem basicamente em um sistema para distribuição do solvente, uma válvula de injeção, uma coluna de alta pressão, um detector e um computador para operar o sistema e apresentar os dados obtidos na corrida cromatográfica (HARRIS, 2003).

#### ***2.3.2.1 – Extração***

A obtenção de bons resultados analíticos implica, muitas vezes, em um processo prévio de extração e purificação dos analitos para que se promova a remoção de interferentes. A extração é uma etapa crucial na recuperação das aminas. Qualquer problema ocorrido nesta etapa pode resultar negativamente nos valores de recuperação (ÖNAL, 2007). De acordo com a literatura, uma gama de solventes pode ser utilizada para extração das aminas biogênicas. Geralmente os solventes extratores são escolhidos de acordo com a matriz envolvida na análise (MORET e CONTE; 1996).

Os métodos disponíveis na literatura geralmente utilizam solventes orgânicos ou solventes ácidos como extrator. Tahmouzi,

Khaksar & Ghasemlou (2011) testaram os solventes ácido tricloroacético (TCA) em duas concentrações (5 % m/v e 10 % m/v), ácido perclórico e metanol (100%), destes, o que apresentou melhores resultados de resolução de pico foi o TCA 5 % m/v. Saaid et al (2009) utilizou também o TCA para extração em amostras de carnes e pescados e HCl 0,1 M para amostras de outros alimentos. Os solventes metanol (50 % m/v, 75 % m/v e 100 % m/v), HCl 0,1 M e TCA (5 % m/v e 10 % m/v) foram testados por Lange et al (2002). Os resultados obtidos demonstraram que o metanol 100 % m/v apresentou uma baixa relação sinal/ruído e os picos mais altos. O TCA 10 % m/v apresentou uma alta relação sinal/ruído e baixa resolução dos picos, entretanto o TCA 5 % m/v apresentou a melhor resolução dos picos.

Segundo Moret & Conte (1996) o HCl 0,1 M é uma boa opção para extração das aminas em amostras de queijo, porém não é indicado para amostras de peixes e carnes pois o extrato apresenta turbidez causando interferências nos picos. Para os autores, a melhor escolha para as matrizes de carnes e pescados é o TCA 5 % pois ele tem a capacidade de precipitar as proteínas diminuindo a turbidez do extrato e consequentemente as interferências.

Outras concentrações de TCA também foram utilizadas para extração, apresentando resultados favoráveis de recuperação. A concentração de 6% m/v de TCA foi utilizada por Chen et al (2010) e por Kung et al (2010) , em ambos os casos, bons resultados de recuperação foram obtidos.

O ácido perclórico também pode ser utilizado para extração das aminas biogênicas (BRASIL, 2011), porém o seu uso não é muito indicado, pois possui propriedades explosivas requerendo cuidados especiais de manuseio (COSTALONGA; FINAZZI; GONÇALVES, 2010).

### 2.3.2.2 – Derivatização

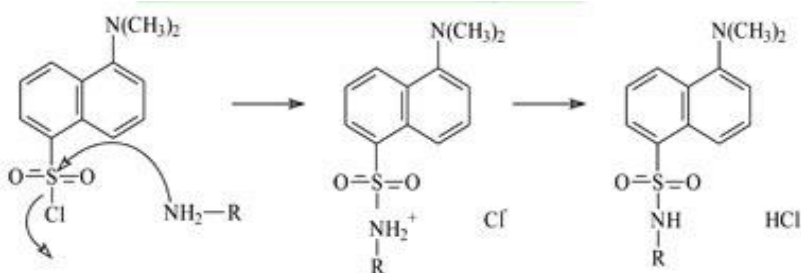
Na literatura, encontram-se diversos reagentes que podem ser utilizados para derivatização das aminas. Dois deles são mais frequentemente utilizados: o cloreto de dansila (Figura 3) e *orto*-ftalaldeído (OPA). As vantagens do uso do OPA é a de formar derivatizados de grande sensibilidade, e apresentar derivatização rápida para aminas primárias, porém o cloreto de dansila derivatiza não só derivatiza aminas primárias como também secundárias. Além disso, os produtos formados com cloreto de dansila são mais estáveis que os



formados usando OPA (FERNANDES, 2001; LAPA-GUIMARÃES e PICKOVA, 2004; SAAID et al., 2009 apud ANLI et al., 2004).

Pineda et al. (2012) utilizou cloreto de dansila em seu trabalho com aminas biogênicas por considerá-lo um reagente com formação de compostos altamente estáveis. A rapidez, simplicidade e a possibilidade de análises em diversas amostras motivou Dadáková; Křížek; Pelikánová (2009) a usar o cloreto de dansila na determinação de aminas biogênicas em alimentos, aplicando sistema de UPLC.

**Figura 3** – Reação da derivatização das aminas com cloreto de dansila utilizado para determinação de aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência.



Fonte: Chromedia, 2013

### 2.3.2.3 – Separação

A grande maioria dos estudos utilizam colunas C18 de fase reversa para separação das aminas biogênicas (KALÁČ et al., 1997; MARCOBAL et al., 2004; LAVIZZARI et al., 2006).

A eluição com gradiente, onde dois solventes diferem em sua polaridade, é geralmente requerida para uma melhor eficiência na separação (SKOOG, 2006). Chen et al. (2010) utilizaram acetonitrila e água como fase móvel com gradiente de eluição e obtiveram bons resultados na separação de nove aminas biogênicas. O gradiente de eluição com acetonitrila e água também foi utilizado na quantificação de oito aminas biogênicas em amostras de pescados e derivados (ZHAI et al., 2012).

### 2.3.2.4 – Detecção

A detecção das aminas biogênicas pode ser realizada em diferentes comprimentos de onda e em diferentes detectores. Os detectores mais comumente utilizados são o ultravioleta e o detector de fluorescência (ONAL, 2007).

Kalač et al. (2002) determinou 5 aminas em cervejas no comprimento de onda de 254 nm. Smelá et al. (2004) utilizou o mesmo comprimento de onda na análise de 8 aminas, quando derivatizadas com cloreto de dansila e utilizou 330 e 440 nm para excitação e emissão quando os compostos foram derivatizados com OPA.

### 2.3.2.5 – Quantificação

A quantificação dos analitos pode ser realizada por padronização interna ou padronização externa. Na padronização interna um composto é adicionado juntamente com a amostra e a área dos analitos é corrigida através da área do padrão interno (PI). O composto que faz a função de PI é um composto com características químicas semelhantes aos analitos de interesse, porém deve-se avaliar se seu pico cromatográfico não elui com o mesmo tempo de retenção dos outros analitos sobrepondo-os (HARRIS, 2003).

Na padronização externa utilizam-se soluções padrão dos analitos de interesse em diferentes faixas de concentração. Para cada faixa de concentração tem-se uma área correspondente que é obtida através do cromatograma. A relação entre a concentração e a área é plotada em um gráfico de dispersão (x,y). Através do gráfico de dispersão é possível encontrar a concentração quando temos os valores da área dos picos das amostras (HARRIS, 2003).

As padronizações interna e externa ainda podem ser utilizadas concomitantemente na quantificação das aminas. Isso acontece quando o PI é adicionado, em uma concentração fixa, nas soluções padrões dos analitos. Para encontrar a concentração faz-se o cálculo da razão entre a área obtida de cada analito e a área do PI (Equação 1) assim, tem-se como resultado, a área corrigida. A área corrigida é plotada da mesma forma em gráficos de dispersão (RIBANI, 2004).

$$\text{Área corrigida} = \frac{\text{área do analito}}{\text{área PI}} \quad (1)$$

Com a utilização da padronização interna e correção da área do analito é possível diminuir o efeito de possíveis falhas durante o procedimento da análise.

O composto 1,7 diaminoheptano é bastante utilizado como padrão interno na quantificação de aminas biogênicas. Eerola et al. (1993) o utilizou como padrão interno na determinação de aminas biogênicas em amostras de salsichas, assim como Kim; Mah; Hwang (2009), Dadáková; Křižek; Pelikánová (2009), Alberto; Arena; Nadra (2002), Zhai et al. (2012) também o utilizaram para diferentes matrizes.

## *2.4 – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS*

A validação analítica pode ser considerada como o processo que define os requisitos analíticos e confirma que o método em consideração tem capacidades de desempenho consistentes com determinadas aplicações. Por outras palavras, a validação de um método analítico é um processo sistemático que pretende demonstrar que a metodologia usada é aceitável para a aplicação requerida (SHAH et al., 2000; CHANDRAN e SINGHI, 2007).

A necessidade de se mostrar a qualidade das medições químicas, através da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está cada vez mais sendo reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis sobre a amostra, ele deve sofrer esta avaliação (RIBANI et al., 2004).

A validação é a comprovação, através do fornecimento de evidências objetivas, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido foram atendidos (INMETRO, 2003). A validação pode ser definida ainda como um processo que confere a validade de um método analítico, instrumento ou equipamento, cujas especificações são aceitas como corretas, conferindo confiabilidade aos resultados obtidos (LEITE, 2008; EURACHEM, 2002; RIBANI et al., 2004).

No Brasil, existem duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899 de 29/05/2003 e o documento DOQ – CGCRE – 008 de março de 2003 (RIBANI et al., 2004).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar que as metodologias de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se uma metodologia for modificada para atender aos requisitos específicos ou um método novo for desenvolvido, o laboratório deve assegurar que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004).

Os termos 'validação' e 'garantia da qualidade' são extensamente usados. Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR ISO/IEC 17025), validar um método é confirmar por exame e fornecimento de evidências objetivas, que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos.

Na prática, a adequação ao uso dos métodos analíticos aplicados a ensaios rotineiros é geralmente avaliada através de estudos de validação de métodos. Tais estudos produzem dados quanto ao desempenho total do método (EURACHEM, 2002).

Quando valida-se um resultado significa que o procedimento, que inclui desde a operação do equipamento até toda a sequência analítica, seja aceito como correto. Para isso são estabelecidos alguns níveis de exigência que podem definir a aprovação do método em estudo (SILVA e ALVES, 2006).

Validações intralaboratoriais correspondem a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, com um mesmo método, para avaliar a mesma ou diferentes amostras, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado, permitindo avaliação de desempenho do método com um número considerável de experimentos, utilizando diferentes combinações de analitos, concentrações e matrizes, em um curto intervalo de tempo e adaptáveis a diferentes situações (SOUZA, 2007).

Especificamente, a validação intralaboratorial de métodos é crítica e fundamental para a aplicação de qualquer método, para garantia da viabilidade de um método antes da formalização de um estudo colaborativo e para fornecimento de evidências de que um método de ensaio é confiável quando estudos colaborativos não são disponíveis (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de uma forma que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados ao método em questão (RIBANI et al., 2004).

A abrangência do processo de validação é determinada de acordo com as necessidades, possibilidades, riscos, custos e prazos. Normalmente, procedimentos mais detalhados são realizados para método não normalizados e quantitativos, sendo sugeridos parâmetros de desempenho como linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, seletividade, exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação (SOUZA, 2007). Estes compreendem indicadores quantitativos do bom desempenho de procedimentos experimentais desenvolvidos e aplicados na determinação de substâncias em diversas matrizes (RIBEIRO, 2008).

#### ***2.4.1 – Parâmetros de validação***

Apesar da divergência quanto à inclusão dos parâmetros de desempenho em um processo de validação de um método analítico, são empregados, normalmente, os seguintes itens: exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, sensibilidade, especificidade, robustez, estabilidade e intervalo de aplicação (LANÇAS, 2004).

##### ***2.4.1.1 – Especificidade e Seletividade***

É a capacidade que o método possui de medir exatamente o composto específico. A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal analítico, e a magnitude do efeito pode depender da concentração (INMETRO, 2003, EURACHEM, 2002).

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento de detecção. Um método que produz resposta a somente um analito é chamado de específico. Um método que produz resposta para vários analitos, mas que se pode distinguir a resposta de um analito e outro é chamado seletivo. Entretanto os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados sem distinção ou com interpretações adversas (INMETRO, 2003).

Geralmente para avaliar a seletividade utiliza-se o método de adição de padrão e a avaliação é feita ajustando-se, no caso de métodos cromatográficos, o cromatograma da amostra sem adição com o da amostra com adição do padrão (INMETRO, 2011).

#### 2.4.1.2 – Faixa de trabalho

Para todos os métodos quantitativos existe uma faixa de valores em concentração do analito na qual o método pode ser aplicado. O limite inferior na faixa de concentração pode ser delimitado pelos valores de limite de detecção e limite de quantificação e o limite superior pode ser definido através do sistema de resposta do equipamento utilizado na medição (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003).

Na faixa de trabalho deve existir uma resposta linear entre o sinal provocado pelo analito e sua concentração. A faixa linear de trabalho de um método é definida como o intervalo entre os níveis inferiores e superiores de concentração do analito no qual pode ser demonstrada a possibilidade de determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas sob as condições especificadas para cada ensaio. No intervalo da faixa de trabalho encontrada a sensibilidade deverá ser considerada constante e expressa nas mesmas unidades do resultado obtido no método analítico e os valores medidos devem estar linearmente correlacionados com as concentrações do analito. Preferencialmente o valor mais esperado para o analito deve situar-se no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004).

#### 2.4.1.3 – Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004).

A quantificação requer que se conheça a relação de dependência entre a concentração do analito e o sinal medido, para isso constrói-se um gráfico onde estas duas variáveis são plotadas e a partir do método dos mínimos quadrados obtém-se a equação de regressão linear (Equação 2) (INMETRO, 2011; LEITE, 2008).

$$y = ax + b \quad (2)$$

onde,

y = resposta medida (área do pico)

x = concentração

a = inclinação da curva analítica (sensibilidade).

b = interseção com o eixo y, quando x = 0

O coeficiente de correlação ( $r$ ) é frequentemente usado para indicar a adequabilidade da curva como modelo matemático. Ele expressa a relação de  $x$  e  $y$  na curva. Valores de  $r$  quanto mais próximos da unidade, maior a probabilidade de existir relação linear definida. Um valor superior a 0,90 é usualmente requerido (INMETRO, 2003).

#### *2.4.1.4 – Sensibilidade*

A sensibilidade de um método é o gradiente de resposta da curva de regressão linear e pode ser determinada através da inclinação desta curva. O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação. Se dois métodos possuem igual precisão o mais sensível é o que possui a curva linear com maior inclinação (TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

#### *2.4.1.5 – Exatidão e Tendência*

A exatidão pode ser definida como o grau de concordância entre um valor medido e o valor verdadeiro do mensurando. A exatidão quando aplicada a uma série de dados de resultados de um ensaio implica em uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos que pode ser denominada de tendência (LEITE, 2008; INMETRO, 2003).

A exatidão é avaliada numericamente através da tendência. A determinação da tendência total com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica. A tendência deverá ser corrigida e demonstrada ser desprezível (INMETRO, 2003).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de material de referência certificado (MRC), participações em comparações interlaboratoriais, comparações de métodos e realização de ensaios de recuperação (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; INMETRO, 2011).

##### *2.4.1.5.1 – Material de Referência Certificado (MRC)*

O material de referência certificado é utilizado no processo de validação de um método de ensaio para avaliar o desempenho do laboratório, por isso o fornecimento de MRC é realizado por organismos

reconhecidos e confiáveis, como por exemplo, NIST, LGC, dentre outros. Na avaliação da exatidão utilizando um material de referência, os valores médios obtidos pelo laboratório e o desvio padrão de uma série de ensaios em replicata, devem ser comparados com os valores certificados do material de referência (SILVA e ALVES, 2006).

O material de referência é acompanhado de certificados que possuem o valor da concentração para uma dada substância ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada (FREIRE et al., 2008).

#### *2.4.1.5.2 – Recuperação*

A recuperação é o resultado da estimativa da análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito em questão. A amostra é fortificada com o analito em pelo menos três concentrações distintas: baixa, intermediária e alta, da faixa de uso do método (BRASIL, 2003).

Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximas a 100% são desejáveis. Este teste deve ser realizado comparando-se resultados analíticos de amostras extraídas com soluções padrão que apresentam 100% de recuperação. O cálculo da recuperação é realizado em função da relação da área do padrão com a área da amostra fortificada (INMETRO, 2011):

A limitação do procedimento de recuperação é que o analito adicionado não está necessariamente na forma em que se apresenta naturalmente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações otimistas em relação à recuperação (INMETRO, 2003).

#### *2.4.1.6 – Precisão*

A precisão é a concordância entre os valores experimentalmente obtidos de ensaios independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas (LEITE, 2008; RIBANI et al., 2004).

Precisão é dependente da concentração do analito, devendo ser determinada para diferentes concentrações. Na literatura sobre validação intralaboratorial de métodos, um mínimo de três níveis de concentração, com três a dez replicatas por nível é recomendado (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; INMETRO, 2003; EC, 2002).



A avaliação da precisão de um método pode ser obtida através da repetitividade, reprodutibilidade e precisão intermediária, expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD %) (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2011).

#### *2.4.1.6.1 – Repetitividade*

A repetitividade é a precisão intra-corrida, ou seja, o grau de concordância entre resultados de medições sucessivas efetuadas sobre as mesmas condições de medição: mesmo procedimento, mesmo analista e as mesmas instrumentações dentro de um curto espaço de tempo. Geralmente são avaliadas na repetitividade três medições de três concentrações diferentes: baixa, intermediária e alta. (BRASIL, 2003; INMETRO 2011).

#### *2.4.1.6.2 – Reprodutibilidade*

A reprodutibilidade pode ser denominada também como precisão interlaboratorial que é o grau de concordância entre resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos. É uma ferramenta importante quando o laboratório busca a verificação de desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos através de comparação interlaboratorial (INMETRO, 2011).

#### *2.4.1.6.3 – Precisão intermediária*

A precisão intermediária é a precisão intercorridas, ou seja, é a concordância entre resultados obtidos no mesmo laboratório, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, obtidos sob condições diferentes. Pode-se variar uma ou mais condições no método: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes dias, entre outros. Geralmente a avaliação também é efetuada em três medições com três concentrações diferentes: baixa, intermediária e alta. (BRASIL, 2003; LEITE, 2008; SILVA e ALVES, 2006).

#### *2.4.1.7 – Limite de detecção*

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificado, sob condições experimentais pré-estabelecidas. Para métodos instrumentais a estimativa de limite de detecção pode ser

calculada com base na relação de três vezes o desvio padrão da regressão dividido pela inclinação (BRASIL, 2003).

#### *2.4.1.8 – Limite de Quantificação*

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação pode ser calculado com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base (BRASIL, 2003).

#### *2.4.1.9 – Robustez*

A robustez é conceituada como a susceptibilidade da condição analítica em atender a determinação do teor de analito quanto à variação do sistema analítico, ou seja, é a capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003).

Para determinar a robustez de um método pode-se recorrer ao teste de Youden. Este teste permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Quanto maior a robustez de um método maior será a confiança do método em relação à sua precisão. A robustez de um método cromatográfico pode ser avaliada, por exemplo, por pequenas variações no tempo de extração, tempo de agitação dentre outros (INMETRO, 2011).

Os testes de robustez servem para indicar os fatores que podem influenciar significativamente a resposta do método estudado. Tal fato fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou é transferido, por exemplo, para outro laboratório (CESAR; PIANETTI, 2009).

### *2.5 – INCERTEZA DE MEDIÇÃO*

Em química analítica, existe uma grande ênfase na precisão de resultados obtidos pela utilização de um método específico, mais do que pela rastreabilidade aos padrões definidos ou unidades do Sistema Internacional (SI). Isso levou ao uso de “métodos oficiais” para atender aos requisitos legais e comerciais. Entretanto, como existe a exigência formal para se estabelecer confiança nos resultados, é essencial que o resultado de uma medição seja rastreável a uma referência definida

como tal como uma unidade SI, um material de referência ou, quando aplicável, um método definido ou empírico. Procedimentos internos de controle da qualidade, ensaios de proficiências, credenciamentos podem servir como auxílio para se estabelecer evidência de rastreabilidade para um dado padrão (EURACHEM, 2002).

Em qualquer procedimento de medição de uma grandeza física o resultado será uma estimativa do valor verdadeiro dessa grandeza, logo uma indicação quantitativa referente às parcelas de dúvidas embutidas nessa estimativa é necessária para avaliar a qualidade do resultado de medição (MARTINS et al., 2010).

Segundo o Vocabulário Internacional de Termos Básicos e Genéricos em Metrologia (VIM, 2012) a incerteza de medição é um parâmetro associado ao resultado que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando.

No uso geral, a palavra incerteza está relacionada ao conceito geral de dúvida. No guia EURACHEM (2002) a palavra incerteza, sem adjetivos, se refere tanto a um parâmetro associado a uma gama de valores que o analista acredita que poderiam ser atribuídas ao mensurando, quanto ao conhecimento limitado sobre um valor em particular. A incerteza de medição não implica em dúvida quanto à validade de uma medição; ao contrário, o conhecimento da incerteza implica numa maior confiança na validade do resultado de uma medição.

O conceito de incerteza está ligado diretamente à variabilidade do resultado analítico. Ao considerarmos que o resultado analítico é proveniente de um conjunto de operações, as quais estão sujeitas a variações é a esse conjunto de variações, agrupadas e aplicadas sobre o resultado obtido, que denominamos de incerteza (LEITE, 2008).

Embora o conceito de incerteza de medição tenha sido reconhecido há muitos anos, foi a publicação, em 1993, do “Guia de Expressão de Incerteza na Medição” pela ISO GUM (1998), em colaboração com BIPM, IEC, IFCC, IUPAC, IUPAP e OIML, que formalmente estabeleceu as regras gerais para avaliação e expressão da incerteza em medições, em um amplo espectro de medidas (EURACHEM, 2002).

O guia EURACHEM traduz os conceitos do Guia ISO às aplicações em medições químicas. A primeira edição deste guia foi publicada em 1995 e foi denominada de “Quantificação de Incerteza em Medição Analítica”. A segunda edição foi construída com base na experiência prática da estimativa de incerteza em laboratórios químicos e principalmente da consciência da necessidade de que sejam

introduzidos por um laboratório para estimar a sua incerteza de medição devem ser integrados com medidas de garantia de qualidade existentes, desde que essas medidas frequentemente forneçam a maior parte da informação necessária para se avaliar a incerteza de medição. As abordagens deste guia também são consistentes quanto ao atendimento dos requisitos da ISO 17025.

### ***2.5.1 – Etapas da Estimativa de incerteza***

Para facilitar os cálculos de estimativa de incerteza de medição, o processo foi dividido em 4 etapas (EURACHEM, 2002).

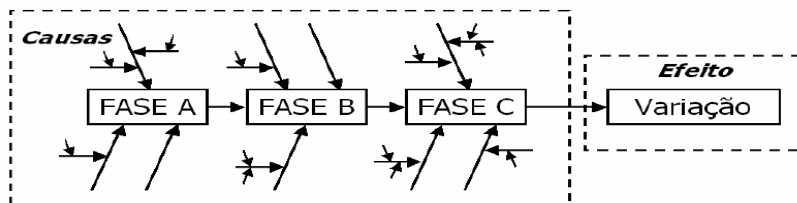
#### ***2.5.1.1 – Especificação do mensurando***

Nesta etapa, objetiva-se a descrição do procedimento de medição. As etapas de medição são enumeradas e a expressão matemática do mensurando e os parâmetros envolvidos são demonstrados (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000).

#### ***2.5.1.2 – Identificação das fontes de incerteza***

Com o objetivo de identificar e analisar as possíveis fontes de incerteza na medição das grandezas avaliadas, os procedimentos adotados em cada etapa devem ser detalhados e estruturados de forma a garantir a máxima abrangência, evitando duplicidade de fontes de incerteza. Normalmente este objetivo pode ser alcançado e melhor visualizado através da utilização de diagramas de causa e efeito, também denominados de diagramas de Ishikawa ou de espinha de peixe (Figura 4) (BUCHMANN e SARKIS, 2002).

Figura 4 – Esquema representativo do diagrama de Ishikawa para identificação das fontes na estimativa da incerteza de medição.



Fonte: BUCHMANN e SARKIS, 2002.

Ao formar a lista de fontes de incerteza, geralmente é conveniente começar com a expressão básica utilizada para o cálculo do mensurando a partir de valores intermediários. Todos os parâmetros nessa expressão podem ter uma incerteza associada ao seu valor e são, portanto, fontes potenciais de incerteza. Além disso, podem haver outros parâmetros que não aparecem explicitamente na expressão utilizada para calcular o valor do mensurando (EURACHEM, 2002).

#### *2.5.1.3 – Quantificar os componentes de incerteza*

Esta etapa mede ou estima a dimensão de cada componente da incerteza associado às fontes potenciais de incerteza identificada. Pode-se determinar uma única contribuição à incertezas provenientes de diversas fontes distintas. É também importante considerar se os dados disponíveis abrangem suficientemente as fontes de incerteza e assegurar para que todas as fontes sejam adequadamente consideradas (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000; EURACHEM, 2002).

É importante reconhecer que nem todos os componentes darão uma contribuição significativa à incerteza combinada. Na prática, é provável que haja contribuição apenas de um número pequeno deles. A não ser que haja um grande número de componentes, aqueles que foram menos que um terço menor do que os componentes maiores, não precisam ser avaliados em detalhes. Uma estimativa preliminar de contribuição de cada componente, ou combinação de componentes, para a incerteza deve ser feita e os que não são significativos devem ser eliminados (EURACHEM, 2002).

#### *2.5.1.4 - Cálculo da incerteza*

Para iniciar os cálculos de incerteza é necessária a identificação do tipo de incerteza de entrada. A avaliação da incerteza é convencionalmente obtida pelo uso do chamado método GUM, que é baseado na definição de uma relação funcional entre uma grandeza aleatória (mensuranda) e várias grandezas de entrada. Cada *input quantity* (grandeza de entrada) tem associada uma função de distribuição de probabilidade que caracteriza razoavelmente o seu comportamento, tendo por isso uma natureza aleatória que condiciona o valor real do mensurando, não permitindo o seu conhecimento exato. Daí a necessidade de associar ao resultado da medição uma estimativa da dispersão dos valores em torno do valor obtido, dada pela incerteza de medição. A incerteza de medição associada às estimativas das grandezas

de entrada é avaliada de acordo com uma de duas formas distintas: avaliação tipo A ou avaliação tipo B. A avaliação da incerteza padrão do tipo A é o método de avaliar a incerteza por análise estatística de uma série de observações independentes para a mesma grandeza de entrada nas mesmas condições de medição. Neste caso a incerteza padrão é o desvio padrão experimental da média que resulta da determinação do seu valor médio. A avaliação da incerteza padrão do tipo B é o método de avaliar a incerteza por outros meios que não a análise estatística de uma série de observações (ISO GUM, 2008).

#### *2.5.1.4.1 – Incerteza do tipo A*

Quando um conjunto de medições é realizado, a média e o desvio padrão estimado ( $s$ ) do conjunto podem ser calculados e a incerteza padrão pode ser calculada através da equação 3.

$$u = s/\sqrt{n} \quad (3)$$

Onde,

$s$  = desvio padrão

$n$  = número de repetições ou valor da distribuição normal

#### *2.5.1.4.2 – Incerteza do tipo B*

As incertezas do tipo B são estimadas usando qualquer outra informação. Podem ser informações de medições em experiências passadas, de certificados de calibração, especificações do fabricante, de informações publicadas e de bom senso do analista (INMETRO, 2003).

#### *2.5.1.4.3 – Incerteza combinada*

Antes da combinação, todas as incertezas devem ser expressas como incerteza padrão, ou seja, desvios padrão. Isso pode envolver a conversão de alguma outra medida de dispersão. Algumas regras são consideradas para converter um componente de incerteza em um desvio padrão (EURACHEM, 2002).

Quando o componente de incerteza é avaliado experimentalmente a partir de medições repetidas, ele pode prontamente ser expresso como desvio padrão. Para contribuições de incerteza única, a incerteza padrão é simplesmente o desvio padrão observado; para

resultados passíveis de média é utilizado o desvio padrão da média (EURACHEM 2002).

No caso da estimativa de incerteza ser originada de resultados e dados previamente estabelecidos, ela pode ser expressa como um desvio padrão ( $s$ ). Contudo quando um intervalo de confiança é dado com um nível de confiança (na fórmula  $\pm s$  a  $p$  %), divide-se o valor de  $s$  pelo ponto de percentagem apropriado da distribuição normal. Se os limites de  $\pm s$  forem dados sem um nível de confiança e houver razão para esperar que valores extremos sejam prováveis, é em geral apropriado assumir uma distribuição retangular com um desvio padrão  $s/\sqrt{3}$ . Já se os limites de  $\pm s$  forem dados sem um nível de confiança, mas houver razão para esperar que valores extremos sejam improváveis, é em geral apropriado assumir uma distribuição triangular, com desvio padrão de  $s/\sqrt{6}$  (EURACHEM, 2002).

Após as estimativas dos componentes individuais de incerteza, ou grupos de componentes de incerteza, expressá-los como incerteza padrão. O próximo estágio é calcular a incerteza padrão combinada. A equação 4 refere-se à relação geral entre a incerteza padrão combinada  $u_c(y)$  de um valor  $y$  e a incerteza dos parâmetros independentes.

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + u_n^2}$$

Onde:

$u_c$ = incerteza padrão combinada;

$u_1$ = incerteza padrão de um componente.

#### 2.5.1.4.4 – Incerteza expandida

Muitas vezes é necessário expressar a incerteza como um intervalo em torno do resultado de uma medição no qual espera-se abranger uma extensa fração dos valores que podem razoavelmente ser atribuídas ao mensurando. Este tipo de incerteza atribuída ao resultado de uma medição é chamado de incerteza expandida e é denotada por  $U(y)$  (MARTINS et al., 2010).

De acordo com o método proposto pelo Guia ISO (ISO GUM, 2008), a incerteza expandida é obtida através da multiplicação da incerteza combinada pelo fator de abrangência (Equação 5).

$$U_p = k \cdot u_c$$

Onde,

$U_p$  = incerteza expandida;

$K$  = Fator de abrangência;

$U_c$  = incerteza padrão combinada

Um dos parâmetros necessários para expressar a incerteza expandida é a escolha da probabilidade de abrangência ( $p$ ) da distribuição do mensurando  $Y$ ; os valores de  $p$  são usualmente escolhidos como 68,27 %, 90,00 %, 95,45 % ou 99,73 %. A escolha da probabilidade de abrangência depende da aplicação que será destinada à incerteza expandida. As probabilidades de abrangência de 95,45% ou 99,73% são recomendadas em medições obtidas sob condições bem controladas, como por exemplo, em laboratórios. A escolha da probabilidade de abrangência mais adequada é polêmica e, portanto, o importante é explicitar qual o valor foi utilizado para a estimativa da incerteza expandida (ISO GUM, 2008).

O conhecimento da incerteza expandida, força expressar o resultado de uma medição como um intervalo de abrangência simétrico da seguinte maneira:  $Y = [y \pm U(y)] \simeq Y = [y \pm k u_c(y)]$ . Isto significa que o mensurando  $y$  possui limites de  $y - U$  e  $y + U$  para uma dada probabilidade de abrangência  $p$ . Para determinar o  $k$ , é necessário o cálculo dos graus de liberdade efetivos ( $v_{eff}$ ) (Equação 6) da incerteza padrão combinada (FRENKEL, 2006).

O Guia ISO (ISO GUM, 2008) recomenda o uso da fórmula de Welch-Satterthwaite (Equação 9) para o cálculo dos graus de liberdade efetivo.

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (6)$$

Com o  $v_{eff}$  calculado, seleciona-se o coeficiente de abrangência ( $k$ ) (Tabela 1) em um determinado nível de confiança escolhido na tabela de Coeficiente de Student ( $t$ ) (FIDÉLIS, 2004).



Tabela 1 - Valor do fator de abrangência (k) em função do valor de graus de liberdade efetivo ( $V_{\text{eff}}$ ) considerando nível de confiança de 95,5% para cálculos da estimativa da incerteza de medição em medições químicas.

$V_{\text{eff}}$	k
1	13,97
2	4,53
3	3,31
4	2,87
5	2,65
6	2,52
7	2,43
10	2,28
50	2,05
100	2,03
$\infty$	2,00

Fonte: (ISO GUM, 2008)

### 2.5.2 – Erro e incerteza

As medidas invariavelmente envolvem erros e incertezas. Apenas alguns deles ocorrem devido a equívocos cometidos pelo analista. Mais comumente, os erros são causados por padronização ou calibrações malfeitas ou variações aleatórias e incertezas nos resultados. Calibrações frequentes, padronizações e análises de amostras conhecidas podem ser usadas, algumas vezes, para minimizar todos esses fatores, exceto os erros aleatórios (SKOOG, 2006).

Qualquer resultado de medição analítica está sujeito a desvios do valor verdadeiro devido a diversas razões, dentre elas pode-se citar: variação de temperatura em equipamentos volumétrico, reflexões e luz dispersa em instrumentos espectroscópios, interpretações individuais de analistas, recuperação incompleta de extração, são fontes de erros em potencial. Na medida do possível, tais erros devem ser minimizados por controle externo ou corrigidos explicitamente, por exemplo, pela aplicação de um fator de correção (BACCAN et al., 2003).

É importante distinguir erro de incerteza. O erro é definido como a diferença entre um resultado individual e o valor verdadeiro do mensurando. Desta forma o erro é um valor único. A princípio, o valor de um erro conhecido pode ser aplicado como uma correção de um resultado (EURACHEM, 2002).

Os erros que acompanham uma medida podem ser classificados em duas categorias. Os erros determinados ou sistemáticos possuem um

valor definido e pelo menos em princípio, podem ser medidos e computados no valor final. Erros indeterminados ou aleatórios não possuem valor definido, não são mensuráveis e flutuam de um modo aleatório (BACCAN et al., 2003).

#### *2.5.2.1 – Erros sistemáticos*

Os erros sistemáticos tem valor definível e uma causa identificável e são da mesma ordem de grandeza para réplicas de medidas realizadas de maneira semelhantes (SKOOG, 2006).

Em princípio os erros sistemáticos podem ser eliminados, ou podem-se aplicar fatores de correção, desde que sejam constantes. Os erros sistemáticos são aqueles que geram desvios de medidas sempre no mesmo sentido, concorrendo para causar um aumento ou uma diminuição sistemática nas medidas, ou seja, os erros sistemáticos não possuem um caráter aleatório. Alguns exemplos de erros sistemáticos são: erros instrumentais (causados pela má calibração), erros de prelaje (quando se mede uma grandeza com um instrumento de ponteiro), erros devido à presença de impurezas, erros de operação, erros pessoais, erros do método. Dos citados, os erros do método são os mais graves, pois não podem ser eliminados por um bom operador ou por um bom instrumento (LEITE, 2008).

O erro sistemático é independente do número de medições feitas e não pode, portanto, ser reduzido pelo aumento do número de análises sob condições de medições constantes (BACCAN et al., 2003).

#### *2.5.2.2 – Erros aleatórios*

Erros indeterminados ou aleatórios são aqueles que produzem as variações ao acaso, ou aleatórias, que se observam em uma série de medidas (LEITE, 2008).

Os erros aleatórios ou indeterminados existem em todas as medidas. Jamais podem ser totalmente eliminados e são, muitas vezes, a maior fonte de incerteza em uma determinação. Os erros aleatórios são provocados por muitas variáveis incontroláveis que são parte inevitável em toda análise. A maioria dos fatores contribuintes do erro aleatório não pode ser claramente identificada. Mesmo que possamos identificar as fontes do erro geralmente é impossível medi-los, porque a maioria deles são tão pequeno que não pode ser identificado individualmente. Apesar de não poder quantificá-los, estes erros podem ser submetidos a um tratamento estatístico que permite saber o valor mais provável e

também a precisão de uma série de medidas. O efeito cumulativo dos erros individuais, entretanto, faz com que as replicas das medidas flutuem aleatoriamente em torno da média dos conjuntos dos dados (SKOOG, 2006; THOMPSON; WOOD, 1995).

A natureza dos erros aleatórios pode ser diversa e de difícil controle pelo operador, como: umidade, temperatura, iluminação, pureza dos reagentes. Normalmente essa classe de erro é gerada por variações imprevisíveis de grandezas que influem no resultado da medição. Certos erros indeterminados, entretanto, não podem ser reduzidos, como por exemplo, aqueles de decorrentes de flutuações intrínsecas á própria grandeza medida (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIANS, 2000; LEITE, 2008).

A redução do conjunto de erros aleatórios melhora o resultado obtido. Para isso, é necessário conhecer e esclarecer os fatos que levam à emissão mais confiável do resultado analítico (LEITE, 2008).

O erro aleatório não pode ser compensado, entretanto, pode geralmente ser reduzido, pelo aumento do número de observações (EURACHEM, 2002).

### **3 – OBJETIVOS**

#### ***3.1 – OBJETIVO GERAL***

O presente trabalho teve como objetivo principal validar uma metodologia para análise de cinco aminas biogênicas simultaneamente em amostras de atum e calcular a incerteza de medição associada aos resultados.

#### ***3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS***

- a) Desenvolver um método rápido e de simples execução para determinação de aminas biogênicas em amostras de atum;
- b) Validar o método desenvolvido segundo os requisitos contidos no protocolo de validação do INMETRO;
- c) Demonstrar estatisticamente a validade dos resultados obtidos;
- d) Aplicar a metodologia validada em amostras de atuns;

- e) Identificar as fontes de incerteza e calcular a incerteza combinada e expandida para cada analito.

## **4 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 – MATERIAL**

#### **4.1.1 – Amostras de atum**

As amostras de peixe atum (*Scombridae*) fresco, recém-capturado, foram adquiridas em empresas do ramo pesqueiro de Itajaí – SC. As amostras de atum foram congeladas e transportadas em caixas térmicas até o laboratório de Química de Alimentos no departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC.

#### **4.1.2 – REAGENTES UTILIZADOS NAS ANÁLISES**

Os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico, exceto o solvente utilizado na CLAE (acetonitrila) que foi grau cromatográfico. A água utilizada foi purificada através do sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Os solventes da fase móvel foram filtrados em sistemas de filtração a vácuo através de membranas (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Os padrões de aminas biogênicas cadaverina (CAD), espermidina (SPD), espermina (SPM), putrescina (PUT) foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA) histamina (HIS) e triptamina (TRYP) foram adquiridos da Acrós Organic (Morris Plains, EUA).

O padrão interno 1,7-diaminoheptano, o derivatizante cloreto de dansila e a L-Prolina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, EUA).

#### **4.1.3 – Vidrarias e Instrumentos**

As vidrarias utilizadas durante as análises foram de classe A, segundo certificação DIN e calibradas com padrão Rede Brasileira de Calibração (RBC). As pipetas automáticas e micropipetas utilizadas também foram calibradas padrão RBC.

#### **4.1.4 – Equipamento**

Para determinação de aminas biogênicas utilizou-se um cromatógrafo líquido (Modelo: Infinity 1260, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) (Figura 5) equipado com detector de DAD no

comprimento de onda de 254 nm. A coluna utilizada para separação dos analitos foi uma ZORBAX Eclipse C18 de fase reversa com medidas de 3 mm x 100 mm, 3,5  $\mu$ m de tamanho de partícula (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Após a detecção, os picos foram identificados no cromatograma obtido através do *software* CHEMSTATION (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Os picos foram integrados através do mesmo *software* e a partir da integração obteve-se os valores de área, largura, altura e simetria dos picos.

Figura 5 – Cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado nas análises de aminas biogênicas.



#### ***4.1.5 – Preparo das soluções***

##### ***4.1.5.1 – Solução padrão de aminas***

Para o preparo da solução contendo as seis aminas, pesou-se separadamente os padrões considerando a massa em base livre, ou seja, sem a massa cloreto. As massas foram dissolvidas em HCl 0,1M e o volume aferido para 25mL.

A solução contendo a mistura de padrões utilizada para avaliação da recuperação dos analitos foi preparada igualmente porém, o solvente utilizado foi água ultrapura.

#### *4.1.5.2 – Solução padrão interno*

As soluções de padrão interno foram preparadas pesando-se o 1,7-diaminoheptano e dissolvendo-se em HCl 0,1M. Nos ensaios de recuperação o padrão interno foi dissolvido em água ultrapura. A concentração final do padrão interno para injeção foi de 6 mg.kg<sup>-1</sup>.

#### *4.1.5.3 – Solução derivatizante*

Para a solução derivatizante pesou-se 100 mg de cloreto de dansila e dissolveu-se em 10 mL de acetona. A solução sempre foi preparada momentos antes de sua utilização.

#### *4.1.5.4 – Solução L- prolina*

A solução de L-prolina foi preparada pesando-se 100mg e dissolvendo-se qsp. 1mL de água ultrapura.

#### *4.1.5.5 – Solvente extrator*

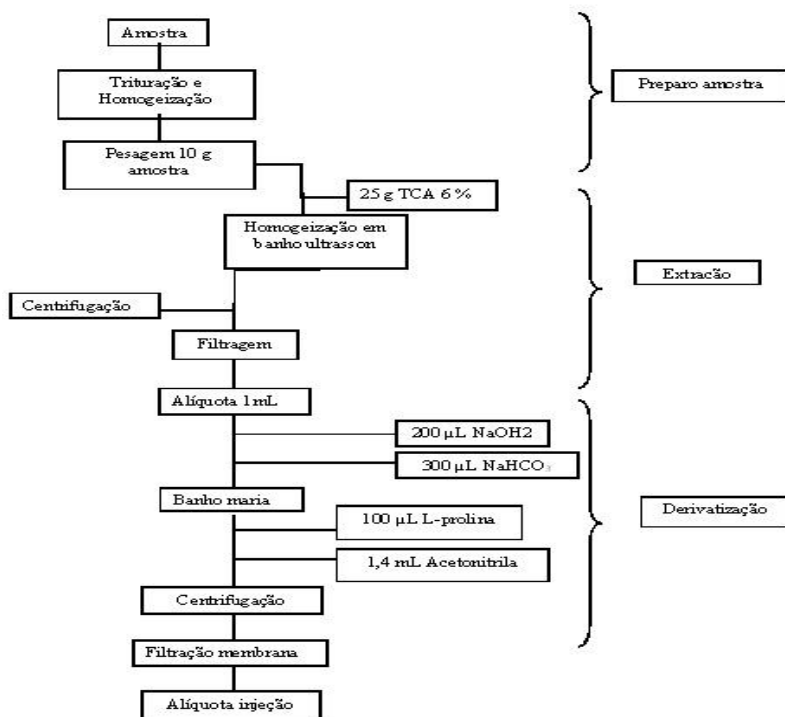
O solvente utilizado para extração das aminas biogênicas da matriz foi o Ácido tricloroacético (TCA) 6% m/v. Para o preparo da solução foram pesados 60 g de TCA, dissolvidos com água ultrapura qsp. 1000 mL.

### *4.2 – MÉTODOS*

#### **4.2.1 – DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS**

As condições do método foram estudadas e experimentadas durante o processo de otimização levando-se em consideração os estudos de outros autores. As condições descritas no método foram as que, em conjunto, apresentaram os melhores resultados na separação, identificação e quantificação dos analitos. A técnica utilizada para determinação de aminas biogênicas foi a cromatografia líquida de alta eficiência e as etapas envolvidas no método foram a extração, derivatização injeção, separação, identificação e quantificação (Figura 6).

Figura 6 – Fluxograma das etapas envolvidas no método para determinação de aminos biogênicas.



Fonte: o próprio autor.

#### 4.2.1.1 – Preparo da amostra

Os atuns após eviscerados foram filetados e tiveram sua pele removida, em seguida diferentes frações do músculo foram retiradas em cubos medindo aproximadamente 50 x 50 mm. Os cubos foram triturados em processador de alimentos (Wallita- SP, Brasil). Após total homogeneização, massas de 10g de amostras foram transferidas para tubos tipo falcon com capacidade de 50mL.

#### 4.2.1.2 – Extração

Nos tubos falcon contendo a amostra, foram adicionados 1 mL de padrão interno e completado o volume para 25 mL com ácido



tricloroacético 6% m/v, com auxílio de uma bureta. O tubo foi transferido para o banho ultrasson (Ultracleaner, SP, Brasil) para possibilitar a total homogeneização entre a amostra e o solvente extrator. Após 15 minutos de extração o tubo foi centrifugado (FANEN, Brasil) por 15 minutos a 3000 rpm. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado em papel filtro Whatman nº 1 e reservado para derivatização.

#### *4.2.1.3 – Derivatização*

Foram pipetados 1mL do filtrado para tubo falcon de 15 mL, adicionou-se 0,2 mL de solução de NaOH 2M e 0,3 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. Homogeneizou-se o conteúdo em vortex (Phoenix, SP, Brasil), adicionou-se 2 mL da solução de cloreto de dansila (10 mg/mL). Incubou-se por 45 minutos em banho termostatizado (SIEGER, Campo Mourão, Paraná, Brasil) a 40°C. Adicionou-se 100 µL da solução de L-prolina (100 mg/mL), a solução foi homogeneizada em vortex e mantida ao abrigo da luz durante 15 minutos. Após adicionou-se 1,4 mL de acetonitrila e a agitação foi mantida por 90 segundos em vortex, centrifugou-se e filtrou-se uma alíquota em membrana 0,45 µm (Millipore) para posterior injeção no cromatógrafo líquido.

#### *4.2.1.4 – Injeção*

A amostra foi injetada através de injetor automático acoplado ao cromatógrafo (Modelo: Infinity 1260 CLAE-DAD, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). O volume injetado foi de 2 µL.

#### *4.2.1.5 – Separação*

A coluna utilizada para separação dos analitos foi uma ZORBAX Eclipse C18 de fase reversa com medidas de 3 mm x 100 mm, 3,5 µm de tamanho de partícula (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). A coluna foi mantida na temperatura de 40°C durante todo processo de separação.

Para separação das aminas utilizou-se como fase móvel água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) com gradiente de eluição (Tabela 2).

Tabela 2 – Gradiente de eluição dos componentes da fase móvel água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) utilizados na determinação de aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência.

<b>Tempo (min)</b>	<b>% Solvente A</b>	<b>% Solvente B</b>
0	40	60
1	40	60
3	25	75
4	25	75
6	5	95
8	5	95
10	40	60
12	40	60

Fonte: o próprio autor

O fluxo da fase móvel também foi com gradiente conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Gradiente do fluxo da fase móvel empregado na determinação de aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência.

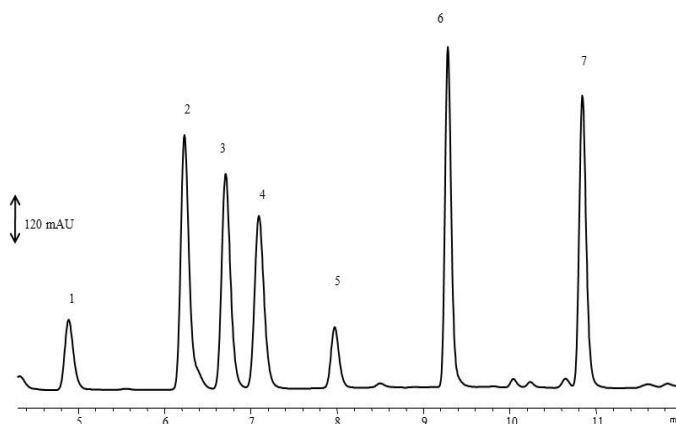
<b>Tempo (min)</b>	<b>Fluxo em mL.min<sup>-1</sup></b>
0	0,4
2	0,5
8	0,5
12	0,4

Fonte: o próprio autor

#### 4.2.1.6 – Detecção, identificação e quantificação.

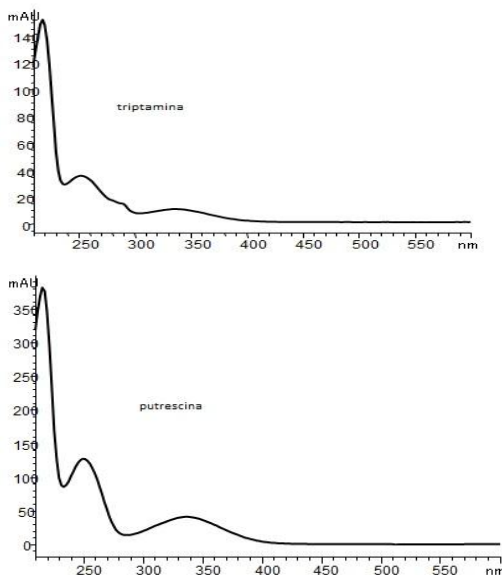
Os analitos após derivatizados foram analisados em cromatógrafo (Modelo: Infinity 1260, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) no comprimento de onda de 254 nm. Após a detecção, os picos foram identificados no cromatograma (Figura 7) através da comparação dos tempos de retenção dos analitos em solução padrão. Cada padrão de amina foi injetado separadamente, e seus espectros foram armazenados na biblioteca do *software* CHEMSTATION (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), para posterior comparação do espectro obtido de cada amina (Figura 8) com os picos obtidos no mix da solução padrão. Os picos foram integrados através do mesmo *software* e a partir da integração obteve-se os valores de área, largura, altura e simetria dos picos.

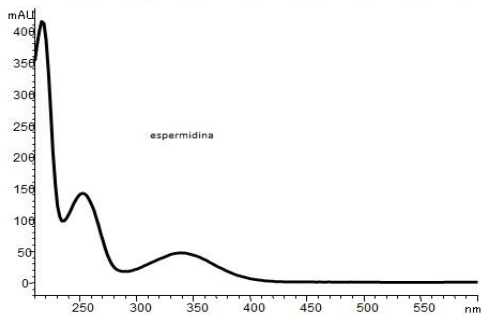
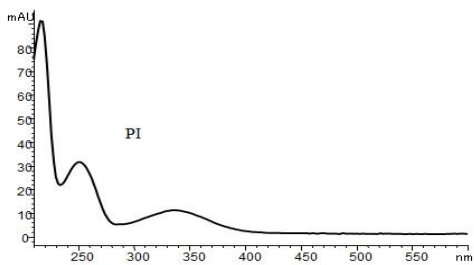
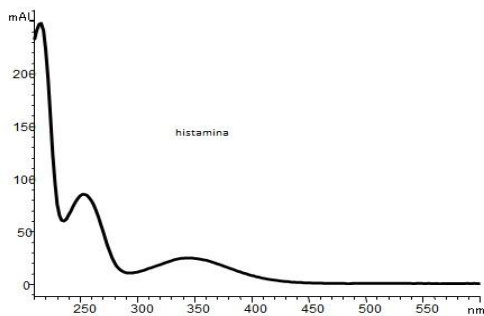
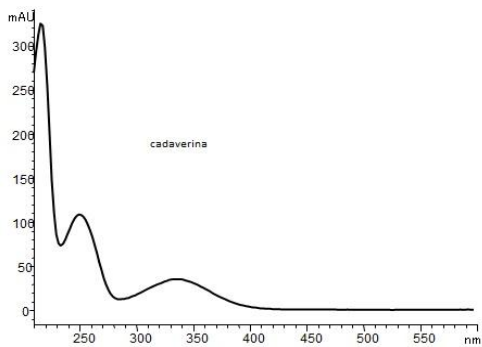
Figura 7 – Cromatograma representativo das seis aminas analisadas e padrão interno: 1 – triptamina, 2 – putrescina, 3 – cadaverina, 4 – histamina, 6 – espermidina, 7 – espermina e 5 – padrão interno (1,7 diaminoheptano).

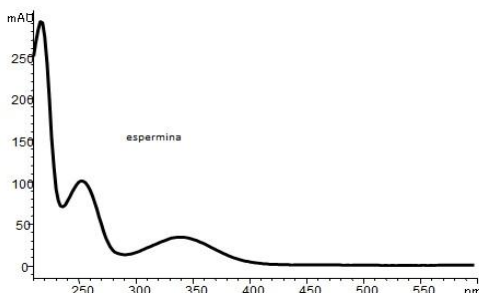


Fonte: o próprio autor

Figura 8 – Espectros de absorção de cada analito (triptamina, putrescina, cadaverina, histamina, PI, espermidina, espermina) utilizados na identificação de cada amina no cromatograma.







Fonte: o próprio autor

## 4.2.2 – PARÂMETROS ANALÍTICOS DE VALIDAÇÃO

### 4.2.2.1 – Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da comparação entre a curva de calibração em solução padrão e a curva de calibração construída em uma amostra branca. As curvas foram contruídas a partir da média de resultados de triplicata verdadeira de cada ponto de concentração. As seletividade foi avaliada estatisticamente através do teste F de Snedecor (Equação 7) de análise de variância entre as curvas e através do teste t (Equação 8, 9 e 10) de análise de médias.

$$F_{\text{calc}} = S^2_M / S^2_m$$

onde,

$S^2_M$  = maior variância

$S^2_m$  = menor variância

$$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}} \quad \text{Variâncias estatisticamente iguais}$$

$$T_{\text{calc}} = \frac{|b_1 - b_2|}{\text{ESD} \sqrt{\frac{1}{S_{xx} \text{ da calib.}} + \frac{1}{S_{xx} \text{ da ad. padr.}}}}$$

$$\text{ESD} = \sqrt{\frac{GL_1 (RSD)^2 + GL_2 (RSD)^2}{GL_1 + GL_2}}$$

$$Sxx = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$
$$RSD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Onde,  
GL = graus de liberdade = (n-2)  
ESD = erro padrão  
RSD = desvio padrão do resíduo

$$T_{calc} < T_{tab} = \quad b_1 = b_2 \quad \text{n\~ao h\~a efeito da matriz}$$

4.2.2.2 – Especificidade

Para avaliar-se a especificidade do método calculou-se os parâmetro de resolução dos picos cromatográficos e número de pratos teóricos. As equações e os valores desejáveis estão descritos na Tabela 4 (RENALI, 2012).

Tabela 4 – Parâmetros de avaliação da especificidade do método.

Parâmetro	Equação	Valores desejáveis
Resolução	$R = \frac{[1,77(t_2 - t_1)]}{(w_2 + w_1)}$	R > 1 (Farmacopéia Europeia)
Número de pratos teóricos	$N = 5,545 \left( \frac{tr}{W} \right)^2$	> 2000 (FDA, 2000)

Fonte: RENALI, 2012

Onde,  
t = tempo de retenção  
t<sub>r</sub> = t<sub>1</sub> = pico do analito  
t<sub>2</sub>= pico do analito mais próximo de t<sub>1</sub>

w = largura do pico

#### 4.2.2.3 – Linearidade

A avaliação da linearidade do método para todas as aminas estudadas foi feita através da equação de regressão linear determinada pelo método dos mínimos quadrados. As curvas foram construídas em triplicatas verdadeiras para cada nível de concentração e os pontos foram injetados aleatoriamente no cromatógrafo líquido. Os valores foram plotados em gráficos de área versus concentração. O teste de Cochran (Equação 11) foi aplicado para comparação de variâncias e para avaliação da condição de homocedasticidade e o teste de Grubbs (Equação 12) foi aplicado para verificação da presença de *outliers*.

$$C_{\text{calc}} = s^2_{\text{Max}} / \Sigma s^2 \quad (11)$$

$$C_{\text{calc}} < C_{\text{tab}} \Rightarrow \text{Homocedasticidade} \quad (12)$$

$$G_{\text{calc}} = (x_i - \bar{x}) / s$$

$$G_{\text{calc}} < G_{\text{tab}} \Rightarrow \text{sem outliers}$$

#### 4.2.2.4 – Exatidão e tendências

A precisão do método foi avaliada através de análises de recuperação. A recuperação dos analitos foi estimada através da análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas dos mesmos. As amostras foram fortificadas nos níveis de concentração da curva de calibração, em triplicatas injetadas aleatoriamente, e as áreas obtidas foram corrigidas por padronização interna e relacionadas com a curva de calibração em solução padrão. Os resultados foram expressos em porcentagem e calculados a partir da equação 13.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{\bar{C}_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (13)$$

Onde,

C1= Concentração do analito na amostra fortificada;

C2 = concentração do analito na amostra não fortificada;

C3= Concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

#### **4.2.2.5 – Precisão**

A precisão do método foi avaliada através de ensaios de repetitividade e precisão intermediária.

##### **4.2.2.5.1 – Repetitividade**

Para avaliação da repetitividade foram realizados ensaios em três níveis de concentração (baixa, intermediária e alta). As soluções padrão foram preparadas independentemente e as análises em triplicata procederam no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e a injeção no equipamento foi feita de forma aleatória. A repetitividade foi avaliada através do desvio padrão relativo.

##### **4.2.2.5.2 – Precisão intermediária**

Para avaliação da precisão intermediária analisou-se em triplicata, três concentrações das aminas em solução padrão (baixa, intermediária e alta). As análises foram realizadas em três dias diferentes, portanto sob condições experimentais também diferentes e injetadas aleatoriamente. A avaliação foi feita através dos cálculos do desvio padrão relativo e do teste de análise de variância ANOVA.

#### **4.2.2.6 – Limite de Detecção e Limite de Quantificação**

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados, respectivamente, com base na relação de três (Equação 14) e dez vezes (Equação 15) o desvio padrão da curva de calibração dividido pela inclinação.

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (14)$$



$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (15)$$

Onde,

DP<sub>a</sub>: desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, três curvas de calibração construídas próximas ao limite de quantificação;  
IC: inclinação da curva de calibração.

#### 4.2.2.7 – Robustez

A robustez foi avaliada através do teste de Youden. Os fatores nominais foram denominados por letras maiúsculas de A a G e a variação por letras minúsculas correspondentes (Tabela 5).

Tabela 5 – Variações nas condições analíticas para avaliação da robustez do método.

TESTE DE YOUTEN										
Variações	M /m	1	2	3	4	5	6	7	8	
1 Extração TCA 6%	30' / 15"	A	A	A	A	a	a	a	a	
2 Centrifugação	15' / 30'	B	B	b	b	B	B	b	b	
3 Agitação após adição DsCl	30" / 90"	C	c	C	c	C	c	C	c	
4 Tempo no banho	45' / 30'	D	D	d	d	d	d	D	D	
5 Derivatização										
6 Tempo agitação Para extração com ACN	120" / 60"	E	e	E	e	e	E	e	E	
7 Centrifugação com ACN	5' / 10'	F	f	f	F	F	f	f	F	
Tempo de análise após reação	60' / 120'	G	g	g	G	g	G	G	g	
Resultados		s	t	u	v	w	x	y	z	

Fonte: o próprio autor

As oito combinações foram ensaiadas e para determinar a variação de cada fator foram combinadas todas as letras maiúsculas subtraindo-se a combinação de todas as letras minúsculas para cálculo de cada efeito (Equação 16).

$\text{Efeito A/a} = \frac{s + t + u + v - w + x + y + z}{4} \quad (16)$
--

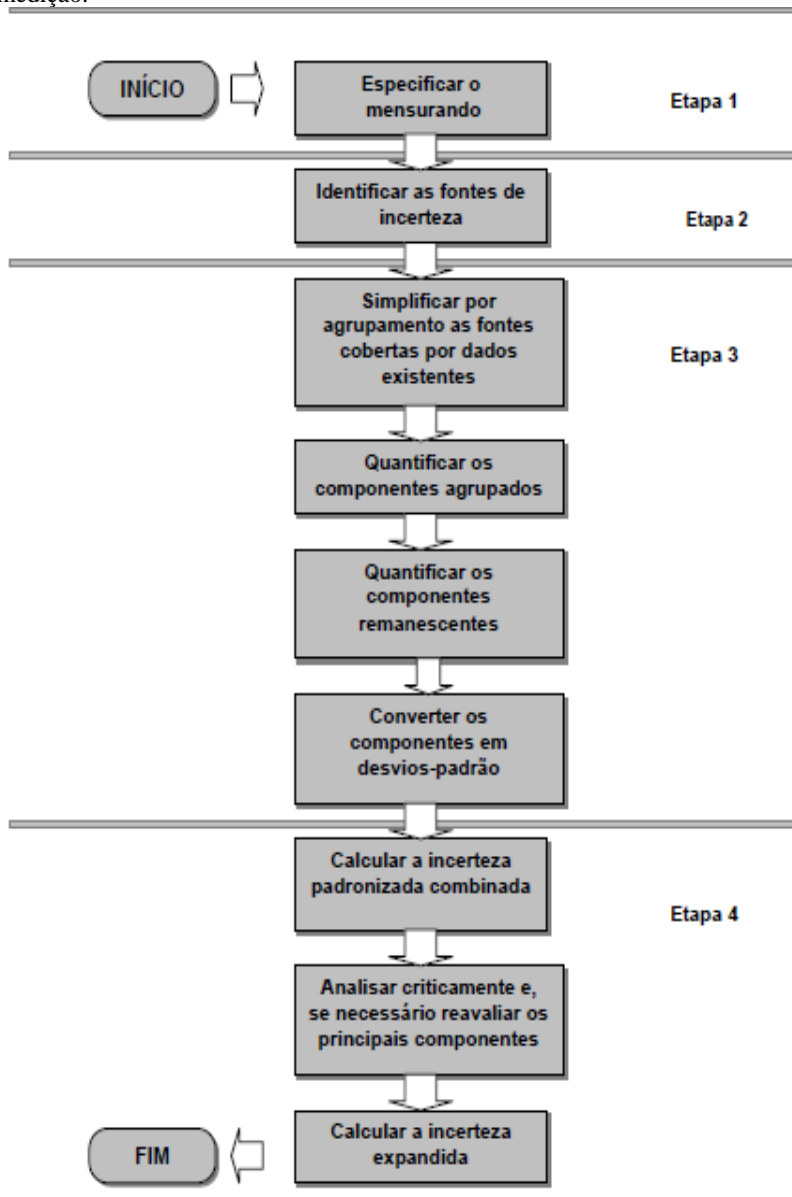
#### **4.2.3 – DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE ATUM CONSERVADAS EM GELO E EM SALMOURA**

Foram analisadas três amostras de atum provenientes de embarcações que utilizaram gelo como método de conservação e três amostras conservadas em sistema de salmoura. A quantificação das aminas biogênicas foi realizada através de padronização externa, aplicando curva de regressão, e por padronização interna utilizando-se o 1,7 – diaminooheptano como padrão interno.

#### **4.2.4 - ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO ASSOCIADA AO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS**

Para estimar a incerteza de medição foram seguidas as etapas descritas na figura 9 especificadas no guia para determinação de incerteza das medições EURACHEM (2002).

Figura 9 – Fluxograma das etapas envolvidas na determinação da incerteza de medição.



Fonte: EURACHEM, 2002.

#### 4.2.4.1 – Especificação do mensurando

Na especificação do mensurando, foi declarado claramente o que está sendo medido através da relação entre o mensurando e as grandezas envolvidas. As etapas de medição foram e os parâmetros dos quais o mensurando depende foram numeradas, resultando em uma expressão matemática (17).

$$C = (LxD)/m \quad .(17)$$

Onde,

D = fator de diluição

m = massa da amostra (g)

L = leitura no equipamento (em  $\text{mg/kg}^{-1}$ ), baseado na curva de calibração (Equação 18)

$$L = (y - b)/a \quad (18)$$

y = área corrigida

a = inclinação da curva de calibração

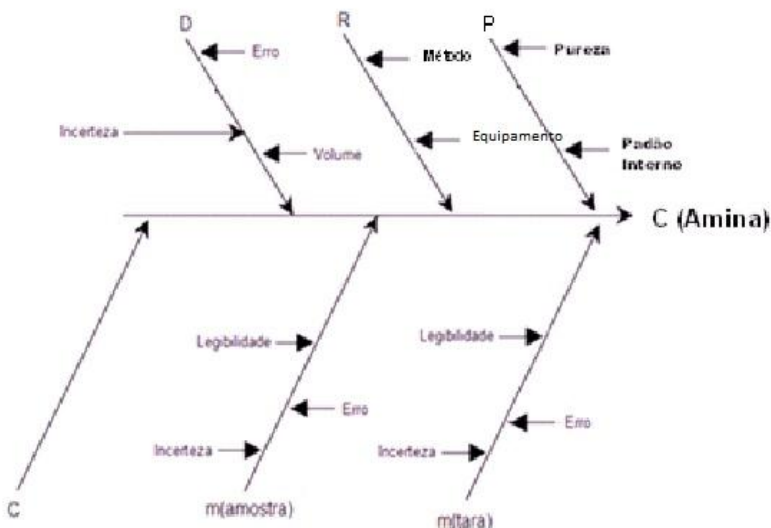
b = intercepto na curva de calibração

A partir da expressão matemática para quantificação do mensurando foram definidas as grandezas de entrada (EURACHEM, 2002).

#### 4.2.4.2 – Identificação das fontes de incerteza

Nesta etapa foram listadas as fontes de incerteza. Além de incluir as fontes estabelecidas na especificação do mensurando, incluiu-se também outras fontes que não estão relacionadas à especificação do mensurando, mas que podem contribuir para a incerteza. Como um meio de facilitar a identificação das fontes, foi construído um diagrama de Ishikawa (Figura 10).

Figura 10 – Diagrama de Ishikawa para identificação das fontes de incerteza para cada amina.



Fonte: EURACHEM, 2002.

As fontes de entrada para incerteza de todas as aminas foram: processo de pesagem, processo de diluição, incerteza do padrão, repetitividade do método e incerteza da curva de calibração. Para cada uma dessas fontes foram identificadas as fontes secundárias descritas na tabela 6.

Tabela 6 – Identificação de cada fonte de entrada e o tipo de distribuição utilizado no cálculo de incerteza de medição.

<b>Tipo de fonte</b>	<b>Fontes</b>	<b>Identificação de cada fonte de entrada</b>	<b>Valor de entrada</b>	<b>Tipo de distribuição</b>
B		Calibração balança (tara)	Valor do certificado de calibração	Normal
B		Erro balança (tara)	Valor do certificado de calibração	Retangular
B	Pesagem	Resolução balança(tara)	Valor do certificado de calibração	Retangular
B		Calibração balança	Valor do certificado de calibração	Normal
B		Erro balança	Valor do certificado de calibração	Retangular
B		Resolução balança	Valor do certificado de calibração	Retangular
B		Calibração bureta 25 mL	Valor do certificado de calibração	Normal
B		Erro máximo bureta 25 mL	Valor do certificado de calibração	Retangular
B		Calibração balão volumétrico 50 mL	Valor do certificado de calibração	Normal
B		Erro máximo balão volumétrico 50 mL	Valor do certificado de calibração	Retangular
B	Diluição	Calibração pipeta 1000 µL	Valor do certificado de calibração	Normal
B		Erro pipeta 1000 µL	Valor do certificado de calibração	Retangular
B		Calibração pipeta 1000 µL	Valor do certificado de calibração	Normal
B		Erro pipeta 1000 µL	Valor do certificado de calibração	Retangular
A		Variação de temperatura (efeito na vidraria)	Coefficiente de dilatação do vidro	Retangular
B	Padrão	Impureza do padrão	Certificado do padrão	Triangular
B		Impureza do PI		Triangular
A		Repetitividade do método	Valor do certificado de calibração	Retangular
A	Repetitividade	Repetitividade do equipamento	Desvio padrão	Retangular
A	Curva de calibração	Curva de calibração	Desvio padrão	Retangular

#### *4.2.4.3 – Quantificação das fontes de incerteza*

Nesta etapa foi estimada a dimensão dos componentes de incerteza associado a cada fonte potencial identificada na etapa 2 e convertida em uma incerteza padrão através da divisão da grandeza de entrada pelo valor associado ao tipo de distribuição associado. A incerteza padrão de entrada foi convertida em incerteza padrão de saída que é a mesma, caso os componentes sejam adimensionais ou estejam na mesma unidade de especificação do mensurando.

#### *4.2.4.4 – Cálculo da incerteza combinada*

As informações obtidas na etapa 3 de diferentes contribuições quantificadas para a incerteza total, seja associadas às fontes individuais ou aos efeitos combinados de diversas fontes. As contribuições foram expressas como desvio padrão, e combinados conforme as regras apropriadas para se ter uma incerteza combinada. O fator de abrangência apropriado foi aplicado para se chegar a uma incerteza expandida (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2000).





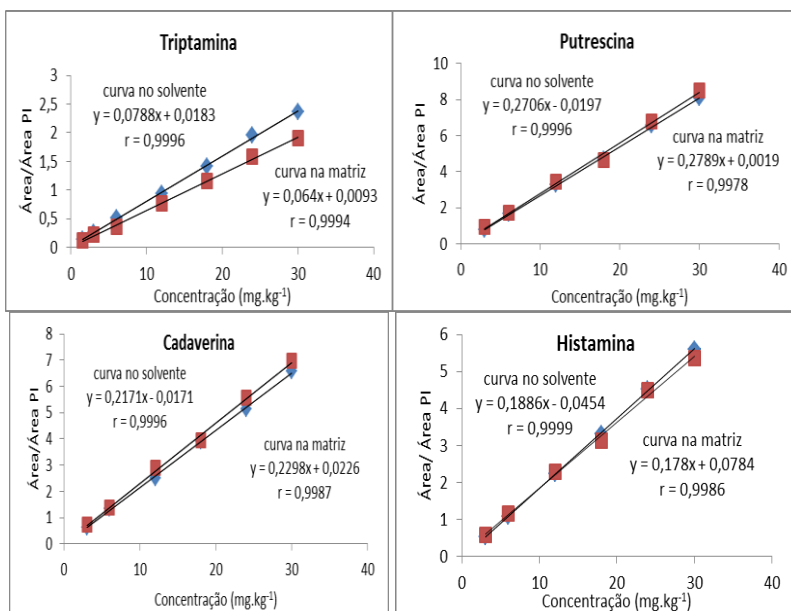
## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

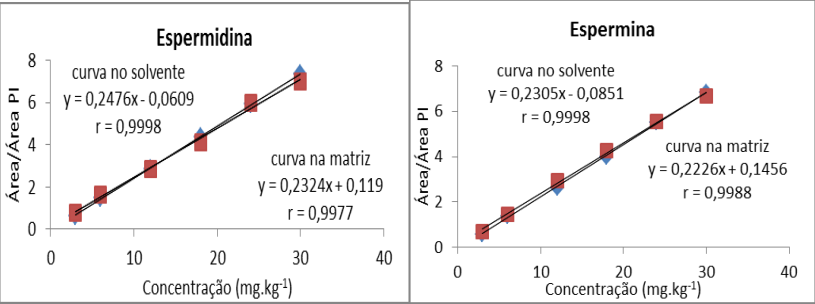
### 5.1 – PARÂMETROS ANALÍTICOS DE VALIDAÇÃO

#### 5.1.1 – Seletividade

Como descrito anteriormente a seletividade do método foi avaliada através da comparação entre a curva de calibração em solução padrão e a curva de calibração construída em uma amostra branca. Esta forma de avaliação da seletividade está relacionada com o efeito da matriz sobre a curva de calibração. A figura 11 ilustra as curvas de regressão na solução padrão e na matriz.

**Figura 11** – Curvas de calibração e equação de regressão construídas em solvente e na matriz na faixa de concentração de 3 a 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .





Fonte: o próprio autor

A comparação entre as variâncias das curvas na solução padrão e na matriz foi efetuada através do teste F de Snedecor. Os valores obtidos estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 – Valores obtidos no teste F de Snedecor para avaliação de igualdade de variâncias entre a curva de calibração em solvente e na matriz.

Amina	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Triptamina	1,52	4,28
Putrescina	1,07	5,05
Cadaverina	1,12	5,05
Histamina	1,12	5,05
Espermidina	1,13	5,05
Espermina	1,07	5,05

Fonte: o próprio autor

Após verificar que, estatisticamente, as variâncias são iguais, portanto a matriz não tem efeito significativo sobre a precisão, o teste T foi aplicado para avaliar se as médias dos resultados das curvas construídas em solução padrão e matriz são estatisticamente iguais, ou seja, a matriz não tem influência nos resultados das análises.

Todos os valores calculados no teste t foram menores que os valores tabelados no intervalo de confiança de 95% portanto é possível concluir que a matriz não tem influência sobre o resultado do ensaio e

que o método possui seletividade adequada. Pode-se afirmar também que não há necessidade de construção da curva de calibração na matriz para quantificação dos analitos.

### 5.1.2 – Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através de cálculos de parâmetros cromatográficos conforme Tabela 8.

**Tabela 8** – Resultados referentes aos parâmetros cromatográficos utilizados para avaliação da especificidade do método de determinação de aminas biogênicas.

PARÂMETRO	TRP	PUT	CAD	HIS	SPD	SPM
<b>Resolução</b>	6,42	2,27	1,74	11,59	9,08	----
<b>nº pratos teóricos</b>	33686,71	58213,15	63498,77	62404,86	230798,23	21389,6,37

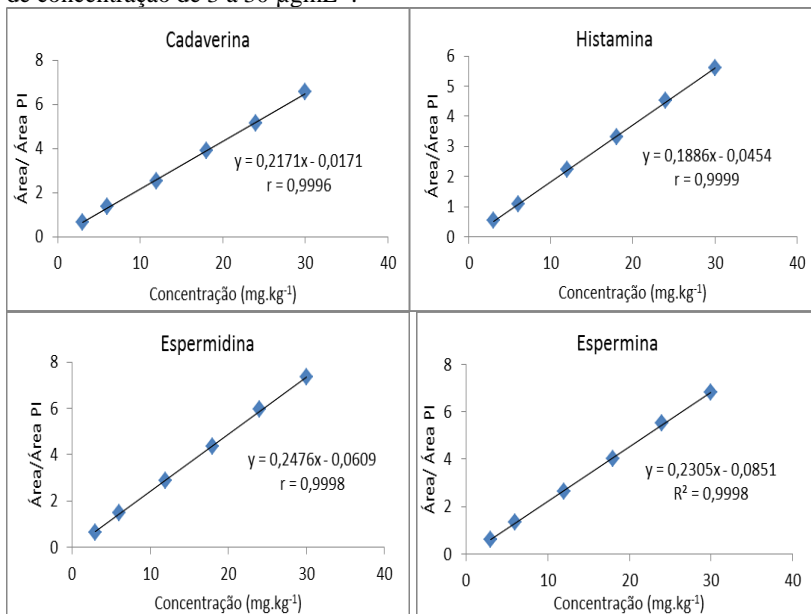
Fonte: o próprio autor

Os valores de resolução calculados são superiores a 1 como especificado na Farmacopéia Europeia, indicando especificidade adequada do método. A FDA (2000) recomenda valores de número de pratos teórico superior a 2000 para garantir eficiência na separação. Todos os valores encontrados atendem ao requisito estabelecido.

### 5.1.3 – Linearidade

A linearidade do método pode ser observada através da equação de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados e testes estatísticos. Os valores para construção dos gráficos das regressões lineares através da área *versus* concentração estão apresentados na figura 12.

**Figura 12** – Curvas de regressão linear (área x concentração) das aminas: triptamina, putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina na faixa de concentração de 3 a 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



Fonte: o próprio autor

A linearidade foi primeiramente avaliada através do coeficiente de correlação ( $r$ ). Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI et al., 2004). O INMETRO (2003) recomenda valores de  $r$  acima de 0,90 para considerar o método linear. Pode-se observar através dos coeficientes de correlação obtidos que o método apresenta linearidade adequada no intervalo analisado para todos os analitos.

O segundo critério de avaliação foi a aplicação do teste de Cochran (1954) na regressão linear para comparação de variâncias e verificação da condição de homocedasticidade (Tabela 9). Quando o valor calculado é menor do que o tabelado, existe a condição de homocedasticidade. Caso o método apresente dependência na precisão das medidas ao longo da faixa de trabalho ele pode ser denominado heterocedástico.

Tabela 9 – Valores de Cochran calculados e tabelados para cada amina em um intervalo de confiança de 95%.

<b>Amina</b>	<b>C<sub>calculado</sub></b>	<b>C<sub>tabelado</sub></b>
Triptamina	0,8239	0,6161
Putrescina	0,3671	0,6838
Cadaverina	0,5338	0,6838
Histamina	0,5856	0,6838
Espermidina	0,3015	0,6838
Espermina	0,3401	0,6838

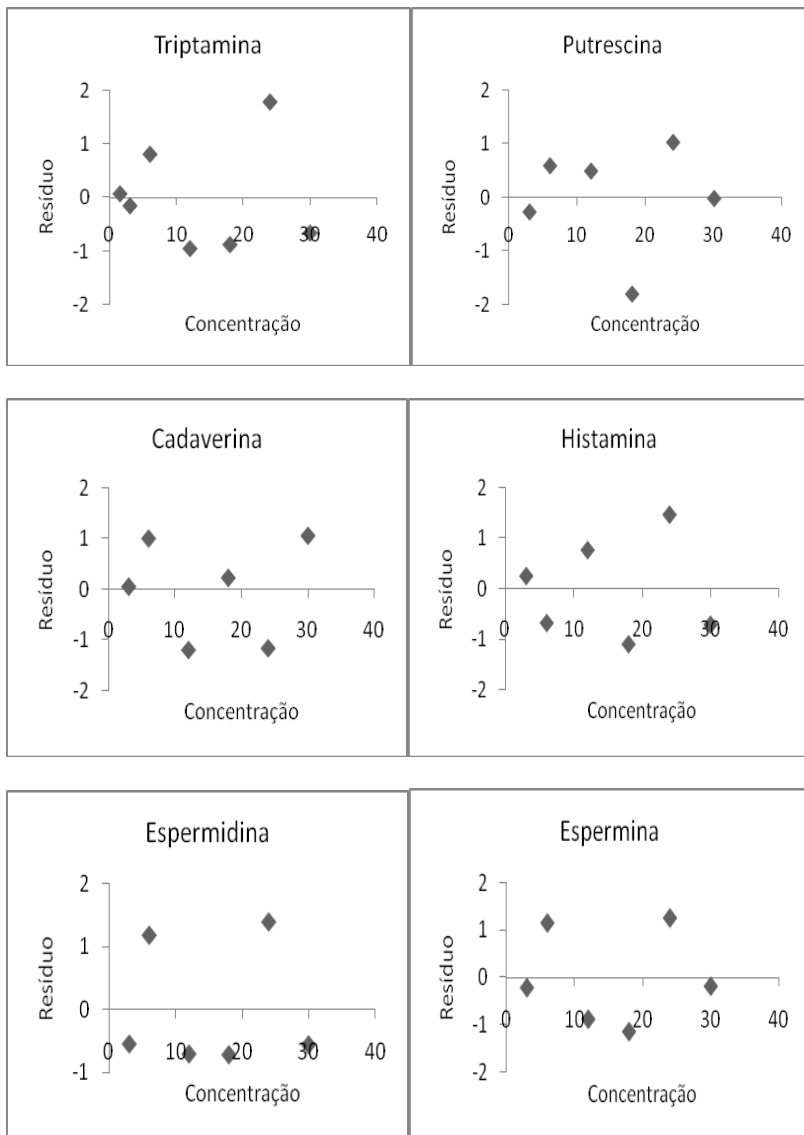
Fonte: o próprio autor

Observando-se os resultados obtidos no teste podemos afirmar que o método apresenta-se homocedástico para as aminas com exceção da triptamina. Apesar dos resultados satisfatórios de coeficiente de correlação para esta amina o teste aplicado demonstra condição de heterocedasticidade.

#### *5.1.3.1 – Resíduos*

Os resíduos foram calculados através da diferença entre os valores esperados e os valores obtidos através da equação de regressão para cada ponto da curva de calibração. A partir dos resultados obtidos foram construídos os gráficos de resíduos para observar a presença ou não de tendências (Figura 13). Quando o gráfico apresenta resultados aleatórios pode-se afirmar que ele está livre de tendências, e isso também pode ser utilizado para confirmação da condição de homocedasticidade do método para o analito em questão.

**Figura 13** – Resíduos da regressão das curvas analíticas versus concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) das amins estudadas.



Fonte: o próprio autor

Todos os gráficos apresentaram aleatoriedade nos pontos indicando que não há tendências.

Para complementar a avaliação, o teste de Grubbs (GRUBBS, 1969) foi aplicado, para verificação de *outliers*.

O teste de Grubbs detecta valores atípicos na distribuição normal quando os valores máximos e mínimos são testados. A curva de regressão da triptamina apresentou um valor discrepante no último nível na curva, ou seja, este valor não pertence à distribuição normal ao nível de significância de 5%. Segundo Chui; Barros; Silva (2009) quando um valor aberrante é encontrado ele é excluído do conjunto e o valor seguinte é testado. O valor seguinte foi testado e o G calculado foi inferior ao valor de G tabelado, indicando que os valores são da distribuição normal. Há uma recomendação para que os valores considerados discrepantes não atinjam 10% dos valores do conjunto (WAENY, 1990).

Os valores testados para as curvas de regressão das demais aminas apresentaram-se menores que o valor de referência para um nível de significância de 5% demonstrando a ausência de *outliers*.

#### **5.1.4 – Exatidão e tendências**

##### **5.1.4.1 – Recuperação**

A recuperação do analito foi estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas dos mesmos (*spike*). As áreas obtidas foram corrigidas por padronização interna e relacionadas com a curva de calibração em solução padrão. A recuperação foi expressa em porcentagem e os resultados tabelados (Tabela 10) são referentes a uma média de três medições de replicatas verdadeiras.

Tabela 10 – Porcentagem de recuperação das aminas em amostras fortificadas nas concentrações de 1,5 a 30 mg.kg<sup>-1</sup> para triptamina e de 3,0 a 30 mg.kg<sup>-1</sup> para as demais aminas estudadas.

Conc. (μ/mL)	% recuperação Triptamina	% recuperação Putrescina	% recuperação Cadaverina	% recuperação Histamina	% recuperação Espermidina	% recuperação Espermina
<b>1,5</b>	81,06	----	----	----	----	----
<b>3</b>	83,96	114,57	115,64	110,62	114,03	113,74
<b>6</b>	73,33	106,99	112,92	117,89	113,32	110,91
<b>12</b>	79,00	105,84	111,87	103,10	97,67	109,02
<b>18</b>	80,63	95,51	101,01	93,71	88,88	105,03
<b>24</b>	82,71	104,79	111,42	99,92	94,26	101,68
<b>30</b>	79,93	104,84	111,96	95,67	92,03	97,86

Fonte: o próprio autor



Com exceção da triptamina em determinadas faixas de concentração, todos os demais analitos apresentaram recuperações na faixa de 80 - 120%. Esta faixa é requerida pela FDA (2003) como limite de recuperação.

Park et al. (2010) encontrou valores de recuperação na faixa de 78,1 a 94,0 % em amostras de cavala para doze aminas analisadas. O valor de recuperação encontrado para a triptamina foi de 79,4%.

A faixa de recuperação de Kim et al. (2009) é de 83,5 a 97,4% em amostras de pescados. O menor valor obtido de recuperação igualmente foi para a triptamina.

Kung et al. (2009) obteve 72,4 % de recuperação para a triptamina em amostras de sanduíches de atum. Os demais analitos ficaram na faixa de recuperação de 89,2 a 105,4%.

### 5.1.5 – Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos ensaios de repetitividade e precisão intermediária.

#### 5.1.5.1 – Repetitividade

Para avaliação da repetitividade foram realizados ensaios em três níveis de concentração (baixa, intermediária e alta). As soluções padrões foram preparadas independentemente e as análises realizadas em triplicata procederam no mesmo dia sob as mesmas condições experimentais. Através das áreas obtidas nas replicatas de cada concentração, calculou-se o desvio padrão e o desvio padrão relativo (Tabela 11).

Tabela 11 – Médias das áreas das triplicatas, desvio padrão e desvio padrão relativo dos ensaios de repetitividade.

Amina	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Média das áreas	Desvio Padrão	Desvio padrão Relativo (RSD %)
<b>Triptamina</b>	6	0,51	0,005	1,06
	12	0,94	0,010	1,72
	24	1,96	0,021	1,06
<b>Putrescina</b>	6	1,65	0,019	1,14
	12	3,26	0,044	1,34
	24	6,56	0,030	0,46
	6	1,34	0,005	0,35

<b>Cadaverina</b>	12	2,51	0,045	1,80
	24	5,12	0,056	1,10
<b>Histamina</b>	6	1,07	0,010	0,95
	12	2,24	0,032	1,45
	24	4,52	0,046	1,01
<b>Espermidina</b>	6	1,49	0,010	0,65
	12	2,87	0,040	1,40
	24	5,95	0,066	1,12
<b>Espermina</b>	6	1,07	0,010	0,95
	12	2,24	0,032	1,45
	24	4,52	0,046	1,01

Fonte: o próprio autor

A resolução n° 899 da ANVISA (BRASIL, 2003) aceita valores de desvio padrão relativo até 5%, enquanto a FDA (2000) admite como critério de aceitação que o desvio padrão relativo não seja superior a 2%. Todos os resultados de desvio padrão relativo para repetitividade são satisfatórios segundo os critérios de aceitação expostos.

Pineda et al. (2012) avaliou a repetitividade do seu método para determinação de aminas biogênicas em vinhos e obteve valores de desvio padrão relativo na faixa de 1,29 a 2,05% para as aminas analisadas.

O desvio padrão relativo encontrado por Eerola et al. (1993) em seu método para determinação de aminas biogênicas em linguças ficou na faixa de 3,9 à 18,1%.

No trabalho de avaliação de um método para determinação de aminas biogênicas em alimentos realizado por Moret e Conte (1996) os desvios padrão relativos foram encontrados na faixa de 3,4 a 12,5 % em amostras de queijos.

O método para determinação de histamina em amostras de atum desenvolvido e validado por Tahamouzi; Khaksar; Ghasemlou (2011) apresentou resultados de repetitividade na faixa de 0,55 a 2,67 % e de precisão intermediária de 1,13 a 1,94 %. Os autores consideraram os valores encontrados muito satisfatórios. Os resultados obtidos no trabalho são bastante próximos aos valores obtidos neste trabalho.

### 5.1.5.2 – Precisão intermediária

Os resultados de precisão intermediária foram obtidos através das análises em triplicata das aminas em solução padrão em três níveis de concentração (baixa, média e intermediária). As análises foram realizadas em dias diferentes, portanto sob condições experimentais também diferentes. Os resultados obtidos foram avaliados através do desvio padrão e desvio padrão relativo (Tabela 12) e os valores críticos de aceitação são os mesmos da repetitividade.

Tabela 12 – Médias das áreas das triplicatas, desvio padrão e desvio padrão relativo dos ensaios de precisão intermediária.

<b>Amina</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Média das áreas</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Desvio padrão Relativo (RSD %)</b>
<b>Triptamina</b>	6	0,51	0,002	0,29
	12	0,92	0,017	1,88
	24	1,95	0,018	0,91
<b>Putrescina</b>	6	1,66	0,0002	0,01
	12	3,13	0,076	2,44
	24	6,45	0,120	1,86
<b>Cadaverina</b>	6	1,35	0,002	0,15
	12	2,48	0,050	2,01
	24	5,16	0,050	0,97
<b>Histamina</b>	6	1,06	0,002	0,17
	12	2,23	0,030	1,37
	24	4,53	0,063	1,40
<b>Espermidina</b>	6	1,49	0,001	0,65
	12	2,87	0,040	1,40
	24	5,95	0,066	1,12
	6	1,36	0,024	1,78

<b>Espermina</b>	12	2,63	0,014	0,52
	24	5,42	0,012	0,22

Fonte: o próprio autor

Os resultados de precisão intermediária obtida por Pineda et al (2012), calculados na forma de desvio padrão relativo, ficaram na faixa de 1,44 à 3,15%

A análise de variância ANOVA (Tabela 13) foi utilizada para avaliar a precisão intermediária das análises nos três diferentes dias e nas três faixas estudadas. Os resultados do teste demonstraram que todos os valores de F calculados foram menores que os valores de F críticos indicando que o método proposto possui precisão adequada.

Tabela 13 – Resultado da análise de variância (ANOVA) para avaliação da precisão intermediária.

<b>Amina</b>	<b>F<sub>calculado</sub></b>	<b>F<sub>crítico</sub></b>
<b>Triptamina</b>	0,0007	5,14
<b>Putrescina</b>	0,0020	5,14
<b>Cadaverina</b>	0,0004	5,14
<b>Histamina</b>	0,0008	5,14
<b>Espermidina</b>	0,0003	5,14
<b>Espermina</b>	0,0015	5,14

Fonte: o próprio autor

### **5.1.6 – Limite de Detecção (LD) e Limite de quantificação**

Os limites de detecção e quantificação foram calculados, respectivamente, com base na relação de três e dez vezes o desvio padrão da curva de calibração dividido pela inclinação. Na tabela 14, encontram-se os limites de detecção e quantificação obtidos para cada amina.

Tabela 14 – Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) calculados para cada amina.

<b>Amina</b>	<b>LD (mg.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>LQ (mg.kg<sup>-1</sup>)</b>
Triptamina	1,07	3,57
Putrescina	0,98	3,28
Cadaverina	0,97	3,22
Histamina	0,49	1,66
Espermidina	0,72	2,41
Espermina	0,79	2,65

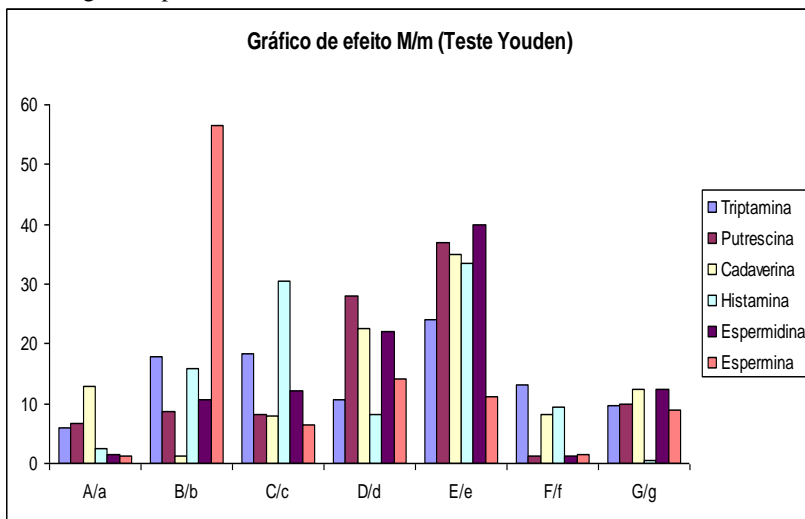
Fonte: o próprio autor

### **5.1.7 – Robustez**

Através do teste de Yoden (1959) foi medida a sensibilidade apresentada pelo método face a pequenas variações nas condições analíticas.

Na figura 14 pode-se visualizar qual a modificação no método analítico provocou maior efeito na sensibilidade do método. O tempo de agitação com acetonitrila para extração das aminas para a fase orgânica foi a variação que apresentou maior efeito para a maioria das aminas. Calculando-se os desvios padrão no conjunto de cada efeito pode-se observar que as variações apresentadas foram pequenas, demonstrando a robustez apresentada pelo método. Segundo Leite (2008) os ensaios de robustez servem como um alerta da susceptibilidade do método às variações, porém não deve ser utilizado como um parâmetro de aprovação ou rejeição da condição analítica. Os demais parâmetros discriminatórios devem ser observados para certificar a condição analítica.

Figura 14 – Representação gráfica dos efeitos de pequenas variações no método cromatográfico para cada amina analisada.



Fonte: o próprio autor

A vantagem do método validado em relação a outros métodos descritos na literatura é, principalmente, o tempo de análise. O tempo total de corrida do método é de somente 12 minutos com total separação das seis aminas estudadas. Com menor tempo de corrida diminuem-se os gastos com solventes da fase móvel, o tempo gasto pelo analista na execução da análise e ainda pode-se oferecer agilidade na entrega dos resultados. O tempo de corrida é de grande importância visto que segundo a legislação vigente (BRASIL, 2011) é necessário analisar-se nove unidades amostrais por lote.

Kung et al. (2009) analisou nove aminas em amostras de sanduíche de atum em uma coluna com dimensões de 125 x 4,6 mm e 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula. O método descrito possui um tempo total de corrida de 30 minutos com fluxo de 1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  o que representa um gasto maior de solvente da fase móvel do que o método desenvolvido neste trabalho.

O método utilizado por Kim; Mah; Hwang (2009) para determinação de aminas biogênicas em amostras de pescados possui um tempo de corrida um pouco superior a 25 minutos. A coluna descrita no trabalho possui as seguintes especificações: 150 x 4,6 mm e 4  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula. Quando se utiliza colunas de menores dimensões

há uma diminuição nos gastos relativos à análise, pois o tempo de corrida é menor.

Pineda et al. (2012) determinou sete aminas biogênicas em amostras de vinho com tempo total de corrida de 40 minutos.

Moret et al. (2005) comparou dois métodos para determinação de oito aminas biogênicas em amostras de vegetais. No primeiro método os analitos foram derivatizados com OPA e no segundo com cloreto de dansila. A coluna utilizada em ambos os métodos possuía dimensões de 250 x 4,6 mm e 5 µm de tamanho de partícula. O tempo total de corrida na derivatização com OPA foi de 60 minutos e com cloreto de dansila foi de 23 minutos. A vantagem da utilização do OPA apresentada no trabalho foi o tempo dispendido na reação de derivatização. A derivatização com OPA foi muito mais rápida que a reação com cloreto de dansila, porém nem todas as oito aminas puderam ser analisadas já que o reagente só derivatiza aminas primárias.

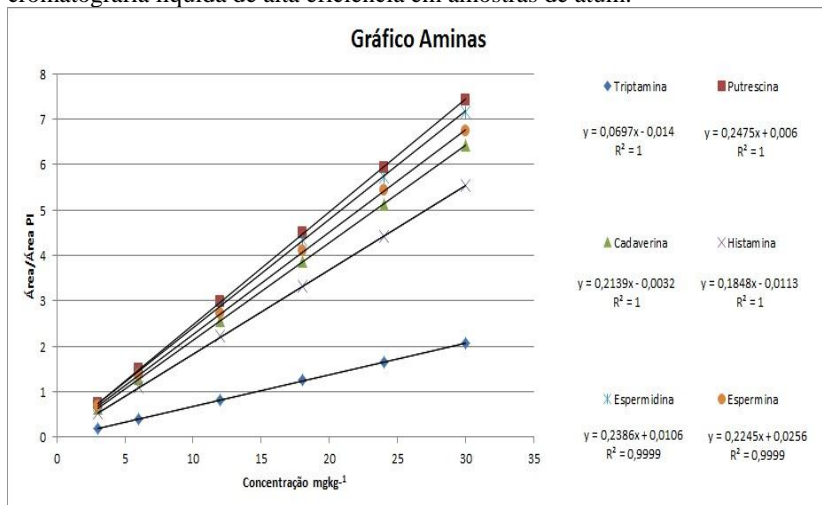
O método oficial para análises de aminas biogênicas utiliza como extrator o ácido perclórico que é explosivo, dificultando seu manuseio, portanto a extração com o ácido tricloroacético torna o método mais seguro. Além disso, a coluna descrita no método possui dimensão 250 mm de comprimento fazendo com que os gastos inerentes à fase móvel e portanto ao método sejam superiores do que quando se utiliza uma coluna de menor dimensão.

Os solventes água e acetonitrila utilizados como fase móvel no método validado são de simples preparo, exigindo somente a filtração em membranas adequadas à esta finalidade, diferente de alguns outros métodos descritos que fazem uso de soluções tampão que são mais trabalhosas em seu preparo e que com o tempo e com a ausência de alguns cuidados são mais danosos às colunas de separação.

## 5.2 – DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE ATUM PROVENIENTES DO SISTEMA DE CONSERVAÇÃO EM GELO E EM SALMOURA

Foram analisadas três amostras de atum provenientes de embarcações que utilizaram gelo como método de conservação e três amostras conservadas em sistema de salmoura. A quantificação das aminas biogênicas foi realizada através de padronização externa, aplicando curva de calibração, e por padronização interna. As curvas de calibração foram construídas através da área versus concentração na faixa linear de 3 a 30 mg.kg<sup>-1</sup> (Figura 15).

Figura 15 – Curvas de calibração para quantificação das aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de atum.



Fonte: o próprio autor

Para cada amina foi calculada concentração através da equação 19.

$$C = \frac{L \times D}{m} \quad (19)$$

Onde,

C= concentração

D = fator de diluição;

m = massa da amostra (g);

L = leitura no equipamento (em  $\text{mg kg}^{-1}$ ), baseado na curva de calibração (Equação 20).

$$L = (y - b)/a \quad (20)$$

y = área corrigida;

a = inclinação da curva de calibração;

b = intercepto na curva de calibração;



As curvas de calibração de todas as aminos apresentaram boa linearidade, com coeficiente de correlação superior à 0,995 atendendo ao critério de aceitação de linearidade segundo a FDA (2000).

Duflos et al. (1999) encontrou valores de  $R^2$  de 0,9189 à 0,9756 quando analisou oito aminos (cadaverina, histamina, metilamina, putrescina, espermidina, espermina, triptamina, tiramina). Os valores de  $R^2$  obtidos por Zhai et al. (2012), quando analisaram oito aminos, ficaram na faixa de 0,9921 à 0,9994 estando mais próximo ao encontrado do presente trabalho, assim como Custódio; Tavares; Glória, (2007) que encontraram valores bem próximos à 1 na análise de 10 aminos.

Na tabela 15 estão apresentados os resultados de cada aminos obtidos nas análises de atuns, conservados após a captura em salmoura e em gelo.

Tabela 15 – Teores das aminas biogênicas encontradas em amostras de atum conservadas em salmoura e em gelo nas embarcações.

Amina	Salmoura 1		Salmoura 2		Salmoura 2		Gelo 1		Gelo 2		Gelo 3	
	Média mgkg <sup>-1</sup>	DP	Média mgkg <sup>-1</sup>	DP	Média mgkg <sup>-1</sup>	DP	Média mgkg <sup>-1</sup>	DP	Média mgkg <sup>-1</sup>	DP	Média mgkg <sup>-1</sup>	DP
<b>TRYP</b>	4,39	0,188	3,68	0,248	9,73	0,036	3,33	0,112	21,27	0,019	7,80	0,055
<b>PUT</b>	ND <sup>a</sup>	-	ND <sup>a</sup>	-	ND <sup>a</sup>	-	ND <sup>a</sup>	-	63,70	0,124	21,35	0,053
<b>CAD</b>	ND <sup>a</sup>	-	ND <sup>a</sup>	-	ND <sup>a</sup>	-	ND <sup>a</sup>	-	50,58	0,082	18,12	0,046
<b>HIS</b>	ND <sup>a</sup>	-	ND <sup>a</sup>	-	ND <sup>a</sup>	-	ND <sup>a</sup>	-	38,42	0,068	13,99	0,045
<b>SPD</b>	6,75	0,011	5,26	0,308	5,41	0,006	4,28	0,267	50,41	0,170	29,80	0,007
<b>SPM</b>	1,45 <sup>b</sup>	0,040	2,34 <sup>b</sup>	0,059	1,75 <sup>b</sup>	0,077	1,58 <sup>b</sup>	0,055	38,87	0,919	30,78	0,011

a = Inferior ao limite de detecção (não detectado)

b = Inferior ao limite de quantificação(LQ espermina = 2,65 mgkg<sup>-1</sup>)

Fonte: o próprio autor

Nas amostras conservadas em salmoura (Tabela 15) não foram encontrados teores quantificáveis de histamina, somente a triptamina e a espermidina foram quantificadas nas três amostras analisadas. Nas amostras conservadas em gelo, foram detectados níveis de triptamina, putrescina, cadaveriana, histamina, espermidina e esperimina. No entanto, nenhuma das amostras apresentou teores de histamina superior ao estabelecido pela legislação brasileira em vigor que é de  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  (BRASIL, 2011). Porém níveis acima de  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ , os quais podem ser suficiente para causar sintomas de intoxicação histamínica, foram obtidos (CDC, 2000).

Silva et al. (2010) determinou histamina em 414 amostras de atuns provenientes da costa brasileira e somente 3,4% apresentaram histamina, com valores variando na faixa de 0,45 à  $70,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Chen et al. (2010) analisou duas amostras suspeitas de ter causado sintomas de intoxicação histamínica em um restaurante de uma escola em Taiwan e encontrou valores de 40,02 e  $52,30 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Não foram encontrados dados na literatura sobre quantificação de aminas biogênicas em amostras de pescados provenientes dos diferentes tipos de métodos de conservação na embarcação: salmourador e gelo. Os resultados obtidos nas análises é um indicativo de que a conservação em salmoura é mais eficiente, pois o pescado atinge menores temperaturas em seu centro térmico mais rapidamente por este método.

### *5.3 – ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO ASSOCIADA AO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS*

Todo o processo de cálculo de incerteza foi dividido em etapas conforme orientação do guia EURACHEM (2002). Os resultados dos cálculos de incerteza de medição combinada e expandida estão apresentados na tabela 16 e são expressos com dois dígitos significativos.

Tabela 16 – Resultados da incerteza combinada e expandida associada a cada amina estudada.

<b>Amina</b>	<b>Incerteza Combinada (<math>\pm u_c</math>)</b>	<b>Incerteza Expandida<sup>a</sup> (<math>\pm U</math>)</b>
Triptamina	0,44	0,88
Putrescina	0,19	0,38
Cadaverina	0,24	0,48
Histamina	0,20	0,40
Espermidina	0,20	0,40
Espermina	0,21	0,42

a = A incerteza relatada é uma incerteza expandida, calculada utilizando um fator de abrangência de 2, que fornece um nível de confiança de aproximadamente 95%.

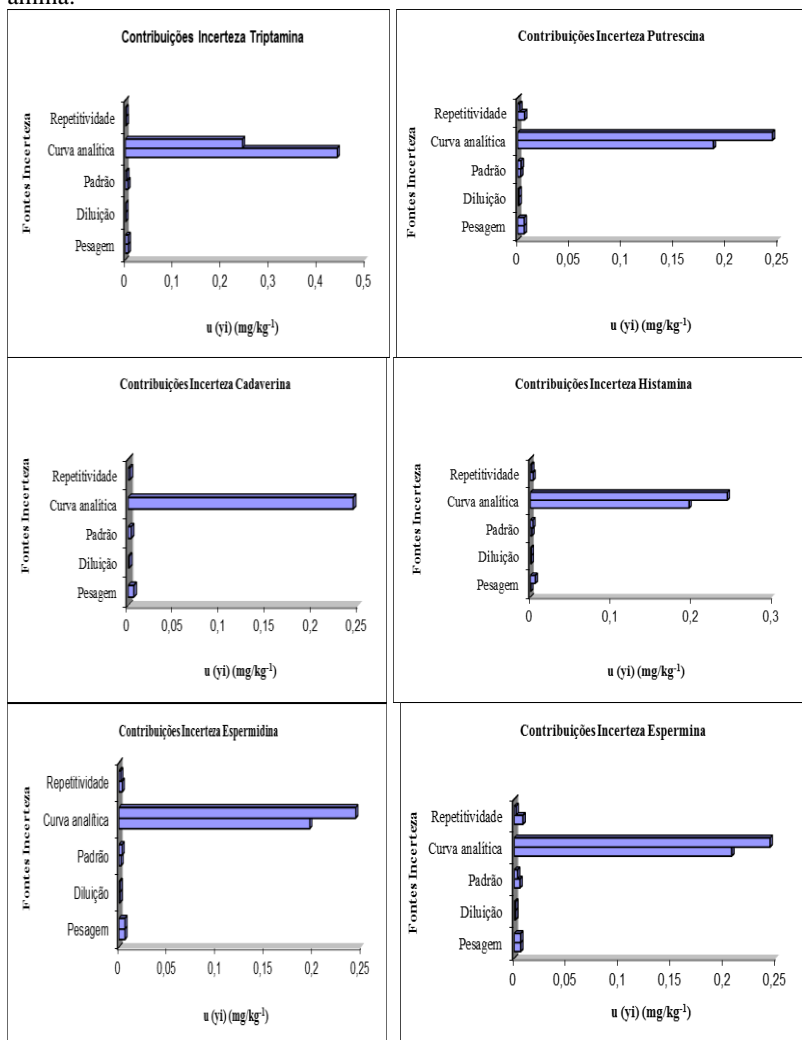
Fonte: o próprio autor

Segundo o guia EURACHEM (2002) para um resultado ser aprovado ele deve ser inferior ao valor limite menos a incerteza expandida. Portanto os resultados obtidos de histamina (única que tem valores estabelecidos na legislação) estão todos aprovados, ou seja, todos são inferiores ao limite menos a incerteza expandida. Por isso é importante ter conhecimento do valor da incerteza de cada método, pois ele permite maior confiança na validade de um resultado (EURACHEM, 2002).

A amina que obteve maior incerteza de medição foi a triptamina, pois o desvio padrão obtido a partir das repetições nos pontos da curva de calibração apresentou-se superior aos encontrados para as demais aminas estudadas.

A contribuição de cada fonte de incerteza foi plotada em gráficos (Figura 16) para visualizar qual a significância na estimativa de incerteza para cada amina estudada.

**Figura 16** – Contribuições de cada fonte: repetitividade, curva analítica, padrão, diluições e pesagens na estimativa da incerteza de medição de cada amina.



Fonte: o próprio autor

A maior contribuição para a incerteza de medição de todas as aminas avaliadas foi a curva analítica. A contribuição da incerteza expandida da curva de calibração para as aminas triptamina, putrescina,

cadaverina, histamina, espermidina e espermina foram respectivamente:  
96,7 - 91,7 - 95,0 - 96,3 - 93,7 - 90,6 %.

## 6 – CONCLUSÃO

O método desenvolvido para determinação das aminas biogênicas triptamina, putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina foi validado segundo o protocolo de validação do INMETRO (2003). Os requisitos avaliados estatisticamente foram: especificidade, seletividade, faixa de trabalho, linearidade, precisão, exatidão e robustez, demonstrando evidência objetiva de que os requisitos específicos para o uso pretendido foram atendidos.

A linearidade foi determinada, sem efeito da matriz para todos os analitos. A seletividade, precisão e exatidão foram comprovadas estatisticamente. Os limites de detecção e quantificação indicaram a capacidade do método em determinar as aminas na matriz de atum. O método apresentou-se robusto salientando maior confiança em relação a sua precisão.

Os parâmetros de desempenho avaliados indicaram a eficiência da utilização do método desenvolvido para determinação de aminas biogênicas.

O método desenvolvido é relativamente rápido e simples quando comparados a outros métodos encontrados na literatura.

Nas seis amostras analisadas foram detectadas triptamina, espermidina e espermina, no entanto somente a triptamina e a espermidina foram quantificadas em todas as amostras.

Em apenas duas amostras foram quantificadas todas as aminas pesquisadas: triptamina, putrescina, cadaverina, histamina, espermina e espermidina. Em nenhuma amostra o valor de histamina extrapolou o limite exigido pela legislação brasileira vigente porém, a quantidade encontrada, de acordo com a literatura, já é suficiente para desencadear alguns sintomas de contaminação histamínica.

A curva de calibração foi a fonte de maior influência sobre o resultado final da incerteza de medição. A incerteza de medição associada à determinação de aminas biogênicas conferiu uma maior confiabilidade aos resultados obtidos





## 7 – REFERÊNCIAS

AGNESE, A.P.; OLIVEIRA, V.M.; SILVA, P.P.O.; OLIVEIRA, G.A. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais em peixes frescos comercializados no município de Seropédica – RJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15 n. 88p. 67-70, 2001.

ALBERTO, M.R.; ARENA, M.E.; NADRA, M.C.M.A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines. **Food Control**, v. 13, p. 125 – 129, 2002.

ASHIE, I.N.A.; SMITH, J.P.; SI8PSON, B.K. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. **Crit. Rev. Food Sci. Nut.**, Boca Raton, v.36, n.182, p.87-121, 1996.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001. 20 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 9000/2000 - **Sistema de Gestão da Qualidade: Fundamentos e Vocabulário**. Rio de Janeiro, ABNT, 2004.

AVDALOV, N. **Manual de control de Calidad y Manipulación de Productos Pesqueros para pescadores y Procesadores artesanales**. Montevideo: INFOPESCA. 53p, 2009.

AVELAR, E. C.; FRANÇA, A. S.; FERRAZ A. P. Desenvolvimento e Otimização de Metodologia de Cromatografia Gasosa para Identificação e Quantificação de Aminas Bioativas em Alimentos. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2005.

AWAN, M. A., FLEET, I.& THOMAS, C. L. P. Determination of biogenic diamines with a vaporization derivatisation approach using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 111, p. 462–468, 2008.

BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J.S. **Química analítica quantitativa elementar**. 3º ed. São Paulo. EdgardBlücher, 324p, 2003.

BAYLISS, P. Chemistry in the kitchen: fish and fish products. **Nutrition and Food Science**, Bradford, n. 1, p. 41-43, 1996.

BELINSKY, D.L.; KUHNLEIN, H.V.; YEBOAH, F.; PENN, A.F.; CHAN, H.M. Composition of fish consumed by the James Bay Cree. **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v. 9, n. 2, p. 148-162, 1996.

BERAQUET, N.J.; LINDO, M.M.K. Transformações bioquímicas “*post mortem*” em pescados. **Bol. ITAL**, Campinas, v.22, n.2, p.169-192, 1985.

BRAMORSKI, A.; VASCONCELLOS, K.S.; THEILACKER, C.; SARDAGNA, C.; GARCIA, G.F. Avaliação dos equipamentos de refrigeração e congelamento dos maiores supermercados do município de Blumenau, SC. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19 n.133p. 20 -23, 2005.

BRASIL. Portaria nº 185 de maio de 1997. Aprova Regulamento técnico de Identidade e Qualidade de peixe fresco (Inteiro e Eviscerado). Diário Oficial da União, 19 maio, seção 1, Brasília, DF. Brasil. Ministério da Agricultura, 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 25, de 06 de junho de 2011. Oficializa os métodos analíticos físico-químicos para controle de pescados e seus derivados. **Diário Oficial da União 03/06/2011**, Brasília – DF.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). R. E, nº 899 de 29 de maio de 2003 - Guia para validação de métodos qualitativos e bioanalíticos. Disponível em: [http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT\\_VERSION&id=15132](http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=15132). Acesso em 25/02/2010.

BRASIL 2004. Resolução - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004 do Ministério da Saúde.

Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial da União, 16 de setembro. Brasília, DF. Brasil. ANVISA, 2004.

BRUCE, B.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim. Acta**, v. 128, p. 93-106, 1998.

BUCHMANN, J. S.; SARKIS, J. E. S. Conceito de incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração. **Química Nova**, V. 25, n. 1, p. 111 – 116, 2002.

CARELLI, D., CENTONZE, D., PALERMO, C., QUINTO, M., ROTUNNO, T. An interference free amperometric biosensor for the detection of biogenic amines in food products. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 640–647, 2007.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention. Scombroid fish poisoning- Pennsylvania, v. 49, p. 398–400, 2000.

CE (Conformite Europeene).Directiva de 22 de Julio de 1991 por la que se fijanlas normas aplicables a laproducción y puesta em el Mercado de los productos pesqueros (91/439/EEC). **Diario Oficial de la Comunidades Europeas**, v. 286, p. 15-34, 1991.

CESAR, I.C.; PIANETTI, G.A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 45, n. 2, p. 235-240, 2009.

CHANDRAN S., SINGH R. S. P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. **Pharmazie** 62:4-14, 2007.

CHANG, S.C., KUNG, H. F., LIN, C. S., TSAI, Y. H. Determination of histamine and bacterial isolation in sword fish fillets (*Xiphias gladius*) implicated in food borne poisoning. **Food Control**, v. 19, n. 1, p. 16 – 21, 2008.

CHEN, H.W.,HUANG,Y.R.,HSU, H. H., CHEN,W.C.,LIN,C.M., TSAI,Y.H. Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes(*Tetrapturusangu- stirostris*) implicated in a food-borne poisoning. **Food Control** v. 21, p. 13–18, 2010.

CHROMEDIA. Chromatography Knowlegde Base. Disponível em: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=zfiqpHsHqnOxmOIIEcCx BAGR&caller=pdfxfsHqnOxmOIIEsGvG&zoekres=yes&scrv=subspfrpHsHqnOxmOIIEcCx BAGRE>. Acesso em 20.01.2013.

CHUI, Q.S.H., BARROS, C.B., SILVA, T.D. Parâmetros r e R obtidos de programa interlaboratorial - como usá-los. **Química Nova**, v.32, n. 8, p. 2209 – 2213, 2009.

CINQUINA, A.L.; CALI, A.; LONGO, F.; DE SANTIS, L.; BACCELLIERI, R.; COZZANI, R. Validation and comparison of analytical methods for determination histamine in tuna fish samples. **Journal of Chromatography A**, v.1032, p. 79-85, 2004.

CODEX 2003 Código de práticas para el pescado y los productos pesqueros, CAC/RCP 52, 146 p. Disponível em: <[www.fao.org/docrep/011/a1553s/a1553s00.htm](http://www.fao.org/docrep/011/a1553s/a1553s00.htm)> Acesso em: 20 out.2011.

COCHRAN, W.G. Some methods for strengthening the common  $\chi^2$  tests. **Biometrics** v. 10 p. 417-451, 1954.

COSTALONGA, A.G.G., FINAZZI, G.A., GONÇALVES, M.A. **Normas de armazenamento de produtos químicos**. Curso de higiene e segurança. Unesp, Araraquara, 2010.

CUSTÓDIO, F.B., TAVARES, E., GLÓRIA, M.B.A. Extraction of bioactive amines from grated Parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents. **Journal of Food Composition and Analysis** 20, 280–288, 2007.

DADAKOVA, E., KRŽEŽEK, M., & PELIKANNOVA, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). **Food Chemistry**, v. 116, p. 365–370, 2009.

DO CARMO, F. B. T.; MÁRSICO, E. T.; S. CLEMENTE, S. C.; DO CARMO, R. P.; FREITAS, M. Q. Histamina em conservas de sardinha. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 174 – 180, 2010.

DONHAUSER, S.; WAGNER, P.; GEIGER, E. Biogenic Amines: Significance, occurrence and assessment. **Brawelt International**, v. 11, p. 100 – 107, 1993.

DRAISCI, R., VOLPE, G., LUCENTINI, L., CECILIA, A., FEDERICO, R., PALLESCHI, G. Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies. **Food Chemistry**, v. 62, p. 225–232, 1998.

DUFLOS, G.; DERVIN, C.; MALLE, P.; BOUQUELET, S. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in Plaice (*Pleuronectes platessa*) and Whiting (*Merlangus merlangus*). **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 82, n. 5, p. 1097-1101, 1999.

EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. **Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results**. Official Journal of the European Communities, 2002, L 221/8.

EEROLA, S.; HINKKANEN, R.; LINDFORDS, E.; HIRVI, T. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 76, p. 575-577, 1993.

ELLISON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. (Eds.). **EURACHEM/CITAC Guide**. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2<sup>o</sup> ed., 2000.

ENTENMILLER, R.R., SOUZA, S. C. Enzymic mechanisms for amine formation in fish. **Seafood Toxins**. American chemical Society, p. 431 – 444, 1984.

EURACHEM. The fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1<sup>o</sup> ed. 1998.

EURACHEM. **Quantifying uncertainty in analytical measurement**, 2nd ed., Eurachem/CITAC Working Group: Helsinki, 2002.

FAO (Food and Agricultural Organization). Disponível em <http://www.fao.org>. Acesso em 07.11.2009.

**FDA. Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, 2000.**

FDA. 2001. Scombrototoxin (histamine) formation. Ch.7. In Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. 3rd ed., p. 83-102. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington, DC. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~comm/haccp4.html>>.

FERNANDES J. O. Desenvolvimento de metodologias de cromatografia gasosa – espectrometria de massa para a determinação de aminas biogénicas em vinhos do Porto e em mostos. 2001. 494 p **Tese da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**. Porto. 2001.

FIDÉLIS, G. **Incerteza de medição**. UFSC, CCA, Florianópolis, 2004.

FRATTINI, V.; LIONETTI, C. Histamine and histidine determination in tuna fish samples using high performance liquid chromatography derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection or UV detection of “free” species. **Journal of Chromatography A**, v. 809 p.241-245, 1998.

FREIRE et al. Contaminantes voláteis provenientes de embalagens plásticas: desenvolvimento e validação de métodos analíticos. **Química Nova**, v. 31 n° 6, p. 1522 – 1532, 2008.

FRENKEL, R. B. **Statistical background to the ISO guide for expression of uncertainty in measurement**. Technology transfer series monograph, n. 2, National Measurement Institute of Australia, 2006.

GANOWIAK, Z.M. **La sanidad en la industria alimentaria marina**. In: SIKORSKI, Z.E. Tecnología de los productos del mar: recursos, composición nutritiva e conservación, Zaragoza: Acribia. p.289-313, 1994.

GASPAR, J.; VIEIRA, R.; TAPIA, M. 1997 Aspectos sanitários do pescado de origem de água doce e marinha, comercializado na feira de Gentilândia, Fortaleza, Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, 11(51): 20–23.

GERMANO, P. M. L.; OLIVEIRA, J. C. F.; GERMANO, M. I. S. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.7, n.28, p.40-45, 1993.

GERMANO, P.M.L. e GERMANO, M.I.S. 1998 Anisakuíase: Zoonose emergente no Brasil? - **Revista Higiene Alimentar**, v.12 n. 54 p. 26-35, 1998.

GIROTTTO, J. M.; MASSON, M. L.; HARACEMIV, S. M. C. Aminas biogênicas em embutidos cárneos e em outros alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 1, p. 1 – 10, 2010.

GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines. In H. Hui; L.L. Nollet. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Ed. Marcel Dekker, v.4, p. 1-38, 2005.

GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, v.11, p. 1-21, 1969.

GLÓRIA, M.B.A.; SOARES, V.F.M. Comparison of fluorometric methods for the determination of histamine in fish. **Arq. Biol. Tecnol.**,v.36, n.2, p.229-235, 1993.

GRAM, L.; WEDELL-NEERGAARD, C.; HUSS, H.H. The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*), **International Journal Food Microbiology**, Netherlands, v. 10 p. 303-316, 1990.

GRAM, L. e HUSS, H.H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal Food Microbiology**, v. 33 n.1 p. 121-137, 1996.

GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, v.11, p. 1-21, 1969.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 42-49, 1994.

HARRIS, D. *Quantitative Chemical Analysis*, 6th Ed., W. H. Freeman, 2003.

HENRY CHIN, K.D., KOEHLER, P.E. Effects of salt concentration and incubation temperature on formation of histamine, phenethylamine

tryptamine and tyramine during miso fermentation. **Journal of Food Protection**, v. 49, p. 423–427, 1986.

HERRERO, M. M. H. Pescado a más consumo más control. Consuma seguridad (el diario de La seguridad alimentaria), Barcelona, 13 jul. 2001. Disponível em: <<http://www.consumaseguridad.com/investigacion/2001/07/13/309.php>>. Acesso em: 20. 10. 2009.

HERNANDEZ-JOVER, T. IZQUIERDO-PULIDO, M. VECIANA-NOGUÉS, M. T., MARINÉ-FOUNT, A., VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines and polyamine contents in meat and meat products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2098 – 2102, 1997.

HWANG, B.S., WANG, J.T., CHOONG, Y.M. A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish products. **Food Chemistry**, v. 82, p. 329 – 334, 2003.

HU Y, XIA W, LIU X. Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. **Food Chemistry**; v. 104 n.1, p.188–95, 2007.

HUSS, H.H.; ABABOUC, L.; GRAM, L. Assessment and management of seafood safety and quality. FAO – Fisheries Technical Paper. Rome: FAO. P. 444, 2004.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Estatística da Pesca 2006 Brasil. Disponível em <http://www.ibama.gov.br>. Acesso em 06.11.2009.

INMETRO. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*. DOQ-CGCRE-008, 2003.

INMETRO. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*. DOQ-CGCRE-008, revisão 4, 2011.

INMETRO. *Vocabulário Internacional de metrologia. Conceitos gerais e termos associados*. 1ª edição. VIM 2012.

ISO GUM - **Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement**; 2a ed. brasileira (1998) da 1a ed. revisada em inglês de



1995 (ISBN:92-67-10188-9); INMETRO/ABNT/SBM/RH Metrologia; Guia para expressão da incerteza de medição.

ISO. **Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM)**-Supplement 1: Numerical Methods for the Propagation of Distributions. BIPM/JCGM, 2008.

JUNIOR, K. S. B. e SERAFIN, W. E. Antagonista histamínico. *In*: GOODMAN, L. S. e GILMAN, A., **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Mc Graw-Hill Interamericana Editores, p. 423-426, 1997.

KAI, M.; MORAIS, C. Vias de deterioração do pescado. *In*: KAI, M.; RUIVO, U.E. **Controle de Qualidade do Pescado**. Santos: Leopoldianum, 1988. p. 13-20.

KALAČ, P., HLAVATÁ, V. KŘÍSEK, M. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. *Food Chemistry*, v. 58, p. 209 – 214, 1997.

KALAČ, P., ŠVECOVA, S., & PELIKANNOVA, T. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. **Food Chemistry**, v.77, 349–351, 2002.

KIM, M. K. MAH, J. H., HWANG, H. J. Biogenic amines and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chemistry*, v. 116, n. 1, p. 87-95, 2009.

KOVACS, A., SIMON-SARKADI, L., & GANZLER, K. Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 836(2), 305–313, 1999.

KUNG, H.F., WANG, T. Y., LIN, C. S., WU, W. S., LIN, C. M. TSAI, Y. H. Isolation and identification of histamine-forming bacteria in tuna sandwiches. **Food Control**, p. 1013 - 1017.

KVASNICKA, F., & VOLDRICH, M. Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. **Journal of Chromatography A**, 1103, 145–149, 2006.

LANARA (Laboratório Nacional de Referência Animal). **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e**

**seus Ingredientes.** Brasília: Ministério da Agricultura, 1981, v.2, cap.11. Pescado Fresco.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise.** São Carlos: Editora Rima, 2004.

LANDGRAF, M. Deterioração microbiana de alimentos. In: FRANCO, B.D.G. LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Editora Atheneu. p. 93-108, 1996.

LANGE, J.; THOMAS, K.; WITTMAN, C. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. **Journal of Chromatography B.**, v. 779, p. 229-239, 2002.

LAPA-GUIMARAES, J., & PICKOVA, J. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. **Journal of Chromatography A**, 1045, 223–232, 2004.

LAPA-GUIMARÃES, J. **Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e uréia como índices químicos de qualidade e frescor de pescado.** Campinas: UNICAMP. 2005. 125 p. (Tese, Doutorado em Tecnologia de Alimentos).

LAVIZZARI, T.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; BOVER-CID, S.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, p. 67-72, 2006.

LEHANE, L; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **International Journal of Food Microbiology** v.58, 1–37, 2000.

LEITE, F. **Validação em análise química.** 5º edição, Editora Átomo, Campinas, 2008.

LEHNINGER, A. (1993) **-Bioquímica.** España: Ediciones Omega S.A., 1993.

LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, p. 70-79, 1999.

LIMA, S.S.J. 2003 Educação patrimonial na área do projeto serra do sossego “Canaã dos Carajás”. MPGE/CRVD-MSS/FIDESA. Belém-PA. Disponível em: <[www.nead.unama.br/prof/admprofessor/file\\_producao.asp?...15](http://www.nead.unama.br/prof/admprofessor/file_producao.asp?...15)> Acesso em: 20 outubro. 2011.

LIRA, G.M.; PEREIRA, W.D.; ATHAYDE, A.H. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió - AL. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, 15(84): 67-72, 2001.

MARCOBAL, A. et al. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, p. 391-396, 2004.

MARINÉ-FOUNT, A. Les amines biogènes en els aliments: història e recerca en el marc de les ciències de l'alimentació. Barcelona: Institut d'estudis Catalans, 2005. Disponível em [http://www.iec.cat/gc/digitalAssets/1807\\_8693\\_1115984404817\\_ANIMES%BIOGENES.pdf](http://www.iec.cat/gc/digitalAssets/1807_8693_1115984404817_ANIMES%BIOGENES.pdf). Acesso em 25 jul 2011.

MARTINS, M. A. F; KALID, R. A.; NERY, G. A.; TEIXEIRA, L. A.; GONÇALVES, G. A. A. Comparação entre os métodos linear e não linear para avaliação da incerteza de medição. **Revista de Controle e Automação**, v. 21, n. 6, 2010.

MÉNDEZ, E.; GONZÁLEZ, R.M.; INOCENTE, G. Lipid content and fatty acid composition of fillets of six fishes from the Rio de La Plata. **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v. 9, n. 2, p. 163-170, 1996.

MORET, S.; CONTE, L.S. High performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods: an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. **Journal of Chromatography A**, v. 729, p. 363- 369, 1996.

MORET, S. *et al.* A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. **Food Chemistry**, v. 89, n. 03, p. 355-361, 2005.

MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura). Disponível em <http://www.mpa.gov.br>. Acesso em 25.09.2010.

MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura). Disponível em <http://www.mpa.gov.br/pescampa/industrial>. Acesso em 22.11.2011.

NISHIKAWA, A. M., ARANHA, S. Métodos físico-químicos para controle de pescado. In Seminário sobre controle de qualidade na indústria de pescados. **Controle de qualidade na indústria de pescado**. Santos. Editora Universitária Leopoldina, São Paulo, 1988.

NUNES, A.M.N. Qualidade de pescados Parte II. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.8 n.32, p. 5-9, 1994.

OLIVEIRA, H. A. C.; SILVA, H. C. M.; SAMPAIO, A. H.; VIANNA, F. A.; SALTER-SAMPAIO, S. Determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em atum e sardinha enlatados. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, p. 179-188, 2004.

OLIVEIRA, R. B. A., EVANGELISTA, W. P., SENA, M. J., GLÓRIA, M. B. A. Tuna fishing capture and post capture practices in the northeast of Brazil and their effects on histamine and other bioactive amines. *Food Control*, v. 25, n. 1, p. 64 – 68, 2012

OLSON, R.E. Marine fish parasites of public health importance. **Journal Seafood Quality Determination**, p. 339-355, 1987.

ÖNAL, A. Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 103, 1475- 1486, 2007.

PACHECO, T. de A.; LEITE, R.G.M.; ALMEIDA, A.C.; SILVA, N. de M.O.; FIORINI, J.E. 2004 Análise de coliformes e bactérias mesófilas em pescado de água doce. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18 n. 116/117, p. 68-72.

PAPROSKI, R. E., ROY, K. I., & LUCY, C. A. Selective fluorometric detection of polyamines using micellarelectrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.946, 265–273, 2002.

PARENTE, E. MATRUSCELLI, M. GARDINI, F., GRIECO, S. CRUDELE, M. A. SUZZI, G. Evolution of microbial populations and

biogenic amines production in dry sausages produced in Southern Italy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 882 – 891, 2001.

PARK, J.S. LEE, C. H., KWON, E. Y., LEE, H. J., KIM, J. Y., KIM, S. H.. Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea. **Food Control**, v. 21 p.1219-1226, 2010.

PIMENTEL, L.P.S. e PANETTA, J.C. Condições higiênicas do gelo utilizado na conservação de pescado comercializado em supermercados da grande São Paulo. Parte I, resultados microbiológicos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17 n.106 p. 56-63, 2003.

PINEDA, A., CARRASCO, J., PEÑA-FARFAL, C. HENRÍQUEZ – AEDO, K. ARANDA, M.. Preliminary evaluation of biogenic amines content in Chilean young varietal wines by HPLC. **Food Control**, V. 23, P. 251-257, 2012.

PRICE, R.J. & P.D. TOM .*Compendium of Fish and Fishery Product Processes, Hazards and Controls*, National Seafood HACCP Alliance for Training and Education. **Food Science and Technology**, 1999

PROCÓPIO, R. C. O. **Ocorrência de bactérias formadoras de histamina em tunídeos utilizados para enlatamento**. 2000. 91f. Tese. Universidade Federal de Niterói.

RENALI – Rede Nacional de Análise de Alimentos. Validação em Métodos Químicos – Eliane Cristina Pires Rego. Porto Alegre, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F.A.L.R., FERREIRA, M.M.C., MORANO, S.C., SILVA, L. R., SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164 – 171, 2008.

RODRIGUEZ-JEREZ, J.J.; MORA-VENTURA, M.T.; CIVERA, T. Istamina e prodottici: un problema attuale-parte I: fattori implicati. **Industrie Alimentari**, Torino, v.33, p.299-307, 1994.

SAAID M.; SAAD B.; HASHIM N. H.; ALI A. S. M.; SALEH M. I. Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. **Food Chemistry**, v. 113 p.1356-1362, 2009.

SASSAKI, L.A., RIBEIRO, P. Intoxicação histamínica por pescado. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 5, n. 18, p. 20-23, 1991.

SCALAN, R. A. Formation and occurrence of nitrosamines in Food. **Cancer Research**, v. 43, n. 5, p. 2435 – 2440.

SEAP (Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca). Disponível em <http://www.presidencia.gov.br/seap>. Acesso em 06.11.2009.

SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, p.675-690, 1996.

SHAH V. P., MIDHA K. K., FINDLAY J. W. A., HILL H. M., HULSE J. D., MCGILVERAY I. J., MCKAY G., MILLER K. J., PATNAIK R. N., POWELL M. L., TONELLI A., VISWANATHAN C. T., YACOBI A. Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research** v. 17 n. 12 p. 1551-1557, 2000.

SHAKILA, R. VIJAYALAKSHMI, K. JEYASEKARAN, G. Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tanil Nadu, India stored at ambient temperature. **Food Chemistry**, v. 75, p. 255 – 259, 2003.

SHIN-HEE, K. et al. Identification of bacteria crucial to histamine accumulation in Pacific Mackerel during Storage. **Journal of Food Protection**, p. 1556 – 1564, 2001.

SILLA-SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 213-231, 1996.

SILVA & ALVES. Como iniciar a validação de métodos analíticos. **Enqualab – Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia**. São Paulo, 2006.

SILVA, E.M.M. e CARVALHO, L.M.J. Armazenamento de pescado: exigências da padronização, cuidados e técnicas de adequação para restaurantes. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20 n.141 p. 50-54, 2006.

SILVA, T.M., SABAINI, P. S., EVANGELISTA, W. P., GLORIA, M. B. A. Occurrence of histamine in Brazilian fresh and canned tuna. *Food Control*, v. 22, p. 323 – 327, 2011.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**, Harcourt Brace College Publishers: USA. 1998.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. Cengage Learning: São Paulo, Brasil, 2006.

SMĚLÁ D., PECHOVÁ P., KOMPRDA T., KLEJDUS B., KUBÁŇ V. Chromatografické stanovení biogenních aminův trvanlivých salámech během fermentace a skladování. **Chem. Listy**, v. 98, p. 432–437, 2004.

SOARES, V. F. M. et al., Teores de histamina e qualidade físico-química e sensorial de filé de peixe congelado. **Ciência e Tecnologia Alimentar**. Campinas, v. 18, n. 4, p.462-470, 1998.

SOUZA, S. V. C. Procedimento par validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos, 2007, Tese Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais – MG.

SMITH, T. A. Amines in food. **Food Chemistry**, v. 6, p. 169 – 299, 1980 – 81.

TAHMOUZI, S., KHASAR, R., GHASEMLOU, M. Development and validation of an HPLC – FLD method for rapid determination of histamine in skipjack tuna fish (*Katsuwonus pelamis*). **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 756 – 761, 2011.

TASSONI, A., GERMANÁ, M. A.; BAGNI, N. Free and conjugated polyamine content in *Citrus sinensis* Osbeck, cultivar brasilino N.L.92, a Navel orange, at different maturation stages. **Food Chemistry**, v. 87, p. 537 – 541, 2004.

TAVENIERS, I., LOOSE, M. BOCKSTAELE, E. V. **Trend Anal Chem**. 23, 2004.

TAYLOR, S.L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 17, p. 91-128, 1986.

TAYLOR, S.L. III-Histamine intoxication. In: CLIVER, D.O. (Ed.). **Foodborne Diseases**, San Diego: Academic Press, Cap. 9, p. 164-168, 1990.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.** v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

THOMPSON, M; WOOD, R. Harminized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure Appl. Chem.** V. 67, n. 4, p. 649 – 666.

USYDUS, Z.; SZLINDER-RICHERT, J.; ADAMCZYK, M. Protein quality and amino acids profiles of fish products available in Poland. **Food Chemistry**, v. 112, p. 139-145, 2009.

VECIANA-NOGUÉS, M. T. *et al.* Histamine and tyramine in preserved and semipreserved fish products. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 6, p. 1653-1655, 1989.

VECIANA-NOGUÉS M.T, MARINÉ-FONT A., VIDAL CAROU M.C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile and organoleptic changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45(6): p. 2036-2041, 1997.

VECIANA-NOGUÉS, M. T., MARINÉ-FONT, A., & VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines in fresh and canned tuna. Effects of canning on biogenic amine contents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4324–4328, 1997a.

VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia e Qualidade do Pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, 2004.

VITALI, L., VALESE, A. C., AZEVEDO, M. S., GONZAGA, L. V., COSTA, A. C. O., PIOVEZAN, M. VISTUBA, J. P., MICKE, G. A. Development of a fast and selective separation method to determine histamine in tuna fish samples using capillary zone electrophoresis. **Talanta**, v.106, p. 181 – 185, 2013.



XAVIER, F. G. ; RIGHI, D. ; BERNARDI, M. M. Histamina, serotonina e seus antagonistas. In: SPINOSA, H. S.; GORNIÁK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara – Koogan, 2007, p. 215-224.

WAENY, J. C. C.; **Associação Brasileira de Controle da Qualidade (ABCQ)**-Nota Técnica 17/90 Repetitividade e Reprodutividade III, São Paulo, 1990.

YOUTDEN, W.J.; **Industrial Quality Control, 1959, 15, 1.**

ZHAI H., YANG X., LI L., XIA G., CEN J., HUANG H., HAO S. Biogenic amines in commercial fish and fish products sold in southern china. **Food Control**. V. 25, P. 303–308, 2012.



## **8 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

O objetivo de desenvolvimento e validação de um método para determinação de amins biogênicas foi atendido. O método validado apresentou-se preciso, exato e robusto. O método também é viável na faixa de aplicação, pois se enquadra na faixa necessária para atender os limites da legislação.

As duas amostras conservadas em gelo no interior das embarcações pesqueiras continham um teor maior de amins biogênicas do que as conservadas em salmouras, porém para afirmar que o método de conservação em salmoura é mais eficiente seria necessário uma amostragem maior. Este estudo pode ser melhor explorado em situações futuras.

A incerteza de medição foi calculada como forma de garantir a confiança nos resultados obtidos.